

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2016

Laura Jakobsson

**UUSI
ANNOSTELUTEKNOLOGIA
PITKÄAIKAISIIN
LÄÄKEAINEANNOSTELUIHIN
PREKLIINISESSÄ
TUTKIMUKSESSA –
ESIMERKKINÄ ESTRADIOLI**

Laura Jakobsson

UUSI ANNOSTELUTEKNOLOGIA PITKÄAIKAISIIN LÄÄKEAINEANNOSTELUIHIN PREKLIINISESSÄ TUTKIMUKSESSA – ESIMERKKINÄ ESTRADIOLI

Opinnäytetyön aiheena on uuden, prekliinisessä tutkimuksessa käytettävän, pitkäaikaiseen steroidilääkeaineannosteluun suunnitellun polymeeri-implantaattivalmisteen, MedRodin, toiminnan testaus ja tarkastelu. Lääkeaineena käytettiin estradiolia ja tavoitteena oli selvittää *in vitro*-dissoluutiokokeen avulla lääkeaineen vapautumista ajan funktiona ja *in vivo*-kokeella tuotteen toimivuutta seuraamalla lääkeaineen vapautumista ja vaikutuksia koe-eläimiin.

MedRod-implantaateille tehtiin aluksi kahden kuukauden dissoluutiokoe. Kokeessa oli neljä erikokoista implantaattia, joista vapautui erisuuruiset lääkeaineannokset. Eri aikapisteistä otettujen näytteiden estradiolipitoisuudet määritettiin HPLC-laitteistolla. Lisäksi ensimmäisten päivien näytteille tehtiin vertailumittauksia ELISA-immunomäärityksellä. Implantaattien *in vivo*-kokeessa estradiolin vaikutuksia tutkittiin seuraamalla koe-eläiminä käytettyjen rottien painon kehitystä, ja punnitsemalla kokeen lopussa hormoniaineenvaihdunnalle herkkien kudosten, maksan ja kohdun, painot. Lisäksi kokeen aikana otettiin eri aikapisteissä seeruminäytteitä, joista määritettiin myöhemmin estradiolipitoisuus ELISA-määrityksellä. *In vivo*-kokeessa oli kolme eläinryhmää: ensimmäisellä ryhmällä oli 10 mm:n ja toisella ryhmällä 20 mm:n implantaatti. Kolmantena oli vertailuryhmä, eläimet ilman lääkettä.

Dissoluutiokokeen perusteella lääkeaineen vapautuminen on hyvin tasaista ensimmäisten päivien vähäisen alkupurkauksen jälkeen. *In vivo*-tutkimuksessa implantoitujen eläimien estradiolitasot nousivat tasaisesti ja samantapaisesti kuin dissoluutiokokeessa. Lisäksi naarasrottien kohtujen painot kasvoivat kokeen aikana, joka todentaa estradiolin anabolisen vaikutuksen. MedRodin ei havaittu aiheuttavan toksisia tai muitakaan haittavaikutuksia tutkittuihin eläimiin. Tuotetta voidaankin pitää vakaana, luotettavana, turvallisena ja kustannustehokkaana vaihtoehtona lääkeaineiden pitkäaikaiseen annosteluun prekliinisessä tutkimuksessa.

ASIASANAT:

Lääkeaineannostelu, prekliininen tutkimus, polymeeri-implantaatti, *in vitro*, *in vivo*, estradioli

Laura Jakobsson

NEW DRUG DELIVERY METHOD FOR LONG TERM DELIVERY IN PRECLINICAL RESEARCH – ESTRADIOL AS AN EXAMPLE

The objective of this Bachelor's thesis was to test and monitor the function of a MedRod implant, a novel long term substance delivery method for preclinical studies. Estradiol was used as an example drug and the aim was to determine the amount of drug release as a function of time by means of an *in vitro* dissolution test. The aim was also to examine the functionality of the MedRod by monitoring the effects and release of estradiol on laboratory animals during the *in vivo* study.

First, a two-month dissolution test was performed with the MedRod implant. Four different size implants with different amount of estradiol load were tested. The estradiol concentrations were measured by HPLC. Additionally, reference measurements were performed using Estradiol ELISA immunoassay. The effects of estradiol were studied in animal test by monitoring e.g. the change of body weight of the animals and the change in the weight of uterus and liver, which are hormone sensitive tissues. In addition blood serum samples were taken at different time points from rats for estradiol concentration measurement with ELISA immunoassay. In the animal study were three animal groups: one with a 10 mm implant, another one with a 20 mm implant and a third group consisting of intact animals without estradiol treatment.

Based on the dissolution test the drug release from the MedRod is highly stable after the first days' initial burst. Estradiol levels were elevated during the *in vivo* study and the release profiles were constantly increasing and similar to *in vitro* release. The uterine weights of female rats were increased at the end of the study, confirming the anabolic effect of estradiol. The MedRod systems were well tolerated and no irritation or inflammation was found in the tissue surrounding the implant, thus proving a comfortable and safe delivery system. The product can be considered a stable, reliable and cost effective alternative for long term drug delivery in preclinical research.

KEYWORDS:

drug delivery, preclinical research, polymer based implant, *in vitro*, *in vivo*, estradiol

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 TEORIAOSUUS	10
2.1 Prekliinisen tutkimuksen tausta	10
2.1.1 Tehokkuustutkimukset	10
2.1.2 Turvallisuustutkimukset	11
2.2 3R-periaate	11
2.2.1 Replacement eli korvaaminen	12
2.2.2 Reduction eli vähentäminen	12
2.2.3 Refinement eli parantaminen	13
2.3 Lääkeaineiden annostelu prekliinisessä tutkimuksessa	13
2.3.1 Injektiot ja oraaliset annostelut	14
2.3.2 Osmoottiset pumput	14
2.3.3 Lääkeainetta vapauttavat matriisit	15
2.4 Estradioli	16
2.4.1 Rakenne ja keskeiset vaikutukset	17
2.4.2 Estradiolin käyttö prekliinisessä tutkimuksessa	17
2.5 Estradiolipitoisuuden määrittämenetelmät	18
2.5.1 ELISA-kitti	18
2.5.2 HPLC	20
3 KOKEELLINEN OSUUS	21
3.1 Implantaattien valmistus	21
3.2 Dissoluutiokoe	22
3.3 <i>In vivo</i> -koe	23
3.3.1 Eläimen painon kehitys kokeen aikana ja kohdun ja maksan painot kokeen lopussa	24
3.3.2 Seerumin estradiolitasot kittikemialla kokeen aikana	24
3.3.3 Kliiniset havainnot kokeen aikana	24
3.4 Tilastolliset analyysit	25

3.4.1 Korrelaatio	25
3.4.2 Studentin T-testi	25
4 TULOKSET	27
4.1 Dissoluutiokokeen estradiolitasot HPLC:llä kokeen aikana	27
4.2 Dissoluutiokokeen estradiolitasot ELISA-kitillä kokeen aikana	29
4.3 <i>In vivo</i> -kokeen tulokset	29
4.3.1 Painon kehitys kokeen aikana	30
4.3.2 Kohdun ja maksan painot kokeen lopussa	30
4.3.3 Seerumin estradiolitasot kittikemialla kokeen aikana	31
4.4 Tilastolliset analyysit	32
4.4.1 Korrelaatio	32
4.4.2 Studentin T-testi	33
5 POHDINTA	35
6 LOPPUPÄÄTELMÄT	39
LÄHTEET	40

LIITTEET

Liite 1. Estradiolin vapautuminen implantaatista *in vitro* -kokeen aikana.
 Liite 2. Posterit.

KUVAT

Kuva 1. Durect Corporationin Alzet-osmoottiset pumput. (Durect Corporation 2016)	15
Kuva 2. Innovative Research of American puristepelletit. (Innovative Research of America 2015)	16
Kuva 3. MedRod-implantaatti. (PreclinApps 2015)	17
Kuva 4. Estradioli. (Tuimala & Tuppurainen 2014)	18
Kuva 5. Valmiit MedRod-implantaatit sterilointipussissa	21

KUVIOT

Kuvio 1. Lääkekehityksen vaiheet. (Salonen 2014)	11
--	----

Kuvio 2. Kilpaileva ELISA-määritys.	19
Kuvio 3. HPLC-laitteisto. (Laboratoryinfo 2015)	20

KUVAAJAT

Kuvaaja 1. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g}/\text{pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 5 mm, OD 2,6), 1-14 vrk.	27
Kuvaaja 2. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g}/\text{pv}$) implantaatista (pituus 5 mm, OD 2,6), 21-56 vrk.	28
Kuvaaja 3. Estradiolin kumulatiivinen vapautuminen implantaateista.	28
Kuvaaja 4. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g}/\text{pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 5 mm, OD 2,6), 1-14 vrk, ELISA-määritys.	29
Kuvaaja 5. Eläinten suhteellinen painon muutos (%), keskiarvo ja keskihajonta) <i>in vivo</i> -kokeen aikana.	30
Kuvaaja 6. Eläinten kohdun paino (mg, keskiarvo ja keskihajonta) kokeen lopussa.	31
Kuvaaja 7. Eläinten maksan paino (mg, keskiarvo ja keskihajonta) kokeen lopussa.	31
Kuvaaja 8. Seeruminäytteiden estradiolipitoisuus <i>in vivo</i> -kokeen aikana.	32
Kuvaaja 9. HPLC- ja ELISA-määritysten välinen korrelaatio.	33
Kuvaaja 10. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 5 mm, OD 3,4), 1-14 vrk.	43
Kuvaaja 11. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 10 mm, OD 2,6), 1-14 vrk.	43
Kuvaaja 12. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 10 mm, OD 3,4), 1-14 vrk.	44
Kuvaaja 13. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 5 mm, OD 3,4), 21-56 vrk.	44
Kuvaaja 14. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 10 mm, OD 2,6), 21-56 vrk.	45
Kuvaaja 15. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 10 mm, OD 3,4), 21-56 vrk.	45
Kuvaaja 16. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 5 mm, OD 3,4), 1-14 vrk, ELISA-määritys.	46
Kuvaaja 17. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 10 mm, OD 2,6), 1-14 vrk, ELISA-määritys.	46
Kuvaaja 18. Estradiolin vapautuminen implantaatista (pituus 10 mm, OD 3,4), 1-14 vrk, ELISA-määritys.	47

TAULUKOT

Taulukko 1. P-arvojen selitykset.	26
-----------------------------------	----

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

3R	Replacement, reduction and refinement. Eläinkokeiden korvaaminen muilla menetelmillä, käytettävien eläinten määrän vähentäminen ja menetelmien parantaminen
17 β -Estradioli	Tärkein luonnollisiin estrogeeneihin kuuluva naishormoni
Dissoluutio	Lääkeaineen vapautumisnopeus valmisteesta
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, entsyymi-immunomääritysmenetelmä
G	Gauge, injektioneulan koon lyhenne
HPLC	High performance liquid chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia
ID	Intradermal, ihonsisäinen
IM	Intramuscular, lihaksensisäinen
Intakti	Käsittelemätön eläin
IP	Intraperitoneal, vatsaontelonsisäinen
IV	Intravenous, laskimonsisäinen
Karsinogeeninen	Syöpää aiheuttava
MedRod	Polymeeripohjainen implantaatti pitkäaikaiseen lääkeaineannosteluun prekliinisessä tutkimuksessa
SC	Subcutaneous, ihonalainen
Stationäärifaasi	Paikallaan pysyvä faasi
Teratogeeninen	Epämuodostumia aiheuttava
TMB	Tetrametyyli-bentsidiini

1 JOHDANTO

Prekliininen tutkimusvaihe on oleellinen osa pitkäaikaista ja kallista lääkekehitysprosessia. Hyvin toteutettu prekliininen vaihe antaa luotettavaa tietoa siitä, voiko uusi lääke siirtyä kliinisen vaiheen testauksiin. Prekliinisen vaiheen turvallisuus- ja tehokkuustutkimuksissa tehdään viranomaismääräysten mukaisesti *in vitro* -kokeiden eli esimerkiksi koeputkissa ja maljoilla tehtävien kokeiden lisäksi testauksia *in vivo*, eli elävillä eläimillä. Tutkittavat lääkeaineet annostellaan eläimille yleisimmin injektoimalla käyttäen neulaa ja ruiskua. (Salonen 2014; Vela, Maldonado & Hamon 2014, 4; Hrapkiewicz, Colby & Denison 2013, 5; Hrapkiewicz, Colby & Denison 2013, 117.)

Tällä hetkellä injektion korvaavia menetelmiä pitkäaikaiseen annosteluun ovat ihon alle asetettavat osmoottiset pumput sekä puristepelletit. Nykyisillä annosteluteknikoilla on kuitenkin puutteensa. Injektoiden ongelmana on eläimille mahdollisesti aiheutuva stressi ja kipu. Toistuvat injektoinnit ovat myös työläitä ja niistä aiheutuu kustannuksia. Pumpun puutteena on, että lääkeannoksen suuruutta ei voi muuttaa kesken tutkimuksen, ja lisäksi pumput ovat suurikokoisia ja kalliita. Puristepelleteillä puolestaan ongelmana on lääkeaineen epätasainen vapautuminen, joka johtuu muita teknologioita suuremmasta lääkeaineen alkupurkauksesta sekä pelletin hajoamisesta ajan myötä, jolloin lääkeainetta vapautuu jokaisesta hajonneesta pelletin osasta. Uusi PreclinApps Oy:n polymeeripohjainen MedRod-implantaatti hyödyntää jo kliinisellä puolella ehkäisyvalmisteissa käytössä olevaa teknologiaa ja tarjoaa prekliiniselle puolelle vakaan ja luotettavan pitkäaikaiseen steroidilääkeaineannosteluun soveltuvan menetelmän. (Rissanen et al. 2015; Hrapkiewicz, Colby & Denison 2013, 117; Herrlich et al. 2012; Singh et al. 2008; Zingerman et al. 1997.)

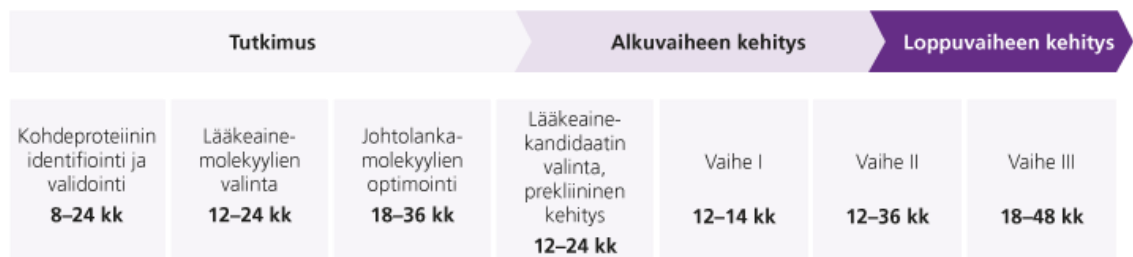
Opinnäytetyön tavoitteena oli MedRod-implantaattien toiminnan testaus ja tarkastelu *in vitro*- ja *in vivo* -kokeiden avulla. Esimerkkilääkeaineena käytettiin 17 β -estradiolia. Neljää eri annoskokoa oleville implantaateille tehtiin aluksi dissoluutiokoe, jossa seurattiin estradiolin vapautumista ajan funktiona. Näytteitä otettiin kahden kuukauden aikana useasta eri aikapisteestä ja näytteiden estra-

diolipitoisuudet määritettiin HPLC-laitteistolla sekä ELISA-immunomäärityksellä. *In vivo* -kokeessa MedRodien toimivuutta ja turvallisuutta tutkittiin muun muassa ELISA-immunomäärityksellä, jolla mitattiin veren seeruminäytteiden estradiolipitoisuus. Lisäksi *in vivo* -kokeessa seurattiin eläinten painon kehitystä ja punnitsemalla kokeen lopussa maksan ja kohdun painot sekä tekemällä yleisesti kliinisiä havaintoja. *In vivo* -kokeessa oli kolme eri ryhmää, joista ensimmäisellä oli 10 mm ja toisella 20 mm implantaatti. Vertailuryhmänä käytettiin intakteja eläimiä, joilla ei ollut implanttia.

2 TEORIAOSUUS

2.1 Prekliinisen tutkimuksen tausta

Lääkekehitys kestää keskimäärin kymmenen vuotta ja maksaa lähes miljardi euroa. Prekliininen tutkimusvaihe on lääkekehitysprosessissa heti uuden lääkeaineen löytämisen ja identifioimisen jälkeen. Prekliinisessä vaiheessa tutkitaan uuden yhdisteen tehokkuutta tiettyyn sairauteen ja varmistetaan uuden lääkekandidaatin turvallisuus, ennen kuin ihmisiin kohdistuvat kliiniset tutkimukset voidaan aloittaa. Prekliinisiin tutkimuksiin kuuluu *in vitro*- ja *in vivo*-kokeita sekä tietokonemallinnuksia. *In vitro*-kokeissa testataan uutta lääkeainetta muun muassa koeputkessa ja maljoilla, ja *in vivo*-tutkimuksissa puolestaan tehdään eläinkokeita. (Orion 2016; U.S. Food and Drug Administration 2015; Salonen 2014; The Research Quality Association 2012; Finnmedi 2005.)



Kuvio 1. Lääkekehityksen vaiheet. (Salonen 2014)

Opinnäytetyössä käytettiin lääketeollisuuden käyttöön tarkoitettuja materiaaleja, joista lääkeainetta vapauttava matriisi valmistettiin, sekä lääkeaineena 17 β -estradiolia. Tässä työssä *in vitro*- ja *in vivo*-kokeilla pyrittiin pääasiassa selvittämään lääkeaineen vapautumismäärää ja vapautumisen tasaisuutta.

2.1.1 Tehokkuustutkimukset

Prekliinisissä tehokkuustutkimuksissa selvitetään, onko lääkeaineella tavoiteltuja vaikutuksia kohdekudokseen, ja voidaanko lääkeainetta alustavan arvion mu-

kaan käyttää tietyn sairauden hoitoon. Uuden lääkeaineen vaikutuksia vertailaan plasebon, eli lumelääkkeen, sekä mahdollisten kilpailevien valmisteiden kanssa. Prekliinisessä vaiheessa tehokkuustutkimuksia voidaan tehdä esimerkiksi soluviljelyllä sekä eläinkokeilla. (News Medical 2014; The International Conference on Harmonisation 1998.)

2.1.2 Turvallisuustutkimukset

Ennen kuin lääkettä voidaan testata ihmisillä, täytyy prekliinisessä vaiheessa tehdä tarkkoja lääkeaineen turvallisuustutkimuksia. Näiden tutkimusten määrä ja tyyppi vaihtelevat lääkkeen vaikutuskohteen mukaan. Prekliinisessä vaiheessa tehtävät turvallisuustutkimukset selvittävät esimerkiksi lääkeaineen mahdollista kroonista toksisuutta, karsinogeenisyyttä, lisääntymistoksisuutta ja teratogeenisyyttä. Lisäksi testeihin kuuluu sekundaarifarmakologiaa eli turvallisuusfarmakologiaa. Tutkimuksilla selvitetään lääkeaineen vaikutuksia tietyissä eläimissä, lääkkeen pitkäaikaisia vaikutuksia sekä mahdollista vaikutusta synnytykseen ja syntyvään lapseen. Prekliiniset turvallisuustutkimukset antavat tietoa erityisesti lääkeaineen annoskoon vaikutuksista. Suuret annokset voivat aiheuttaa haittavaikutuksia tai olla jopa toksisia. (Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 1996; U.S Food and Drug Administration 1997; Southern Research Institute 2013; Holt & Nuttall 2014.)

2.2 3R-periaate

Opinnäytetyön *in vivo* -kokeessa noudatettiin eläinkoelupia myöntävän koe-eläinlautakunnankin vaatimaa 3R-periaatetta, joka tähtää eläinkokeiden eettisempään suorittamiseen. Nimitys tulee sanoista "replacement, reduction ja refinement", jotka tarkoittavat eläinkokeiden korvaamista muilla menetelmillä, käytettävien eläinten määrän vähentämistä ja menetelmien parantamista. 3R-periaatteen esittelivät ensimmäisen kerran vuonna 1959 professorit William Russel ja Rex Burch teoksessaan "The Principles of Humane Experimental Technique". Nykyisin periaate sisältyy esimerkiksi Euroopan lainsäädäntöön, ja

koskettaa kaikkia tieteellisessä tarkoituksessa tehtyjä eläinkokeita. (European Commission 2016; Lääninhallituksen eläinkoelautakunta 2016.) Opinnäytetyössä on huomioitu erityisesti eläinten määrän vähentäminen ja menetelmien parantaminen vähemmän kipua ja kärsimystä aiheuttavaksi.

2.2.1 Replacement eli korvaaminen

Ihmisten ja eläinten biologisen samankaltaisuuden vuoksi eläinkokeiden avulla voidaan saada tarkkoja arvioita lääkeaineiden vaikutuksista ihmiseen. *In vivo* -kokeet ovat kuitenkin kalliita toteuttaa, ja ne ovat myös aikaa vieviä. Kokeiden tilalle on kehitelty useita korvaavia menetelmiä, esimerkiksi erilaiset *in vitro* -menetelmät, joissa käytetään kudosta ja soluja, sekä erilaiset matemaattiset ja tietokonemallinnukset. Näiden lisäksi on myös menetelmiä, jotka perustuvat biokemiallisiin sovelluksiin. (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations 2016; European Commission 2016; National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research 2016.)

2.2.2 Reduction eli vähentäminen

Tämä käsite tarkoittaa mahdollisimman kattavan informaation saamista yhdestä eläimestä niin, että käytettävien eläinten määrää voidaan vähentää heikentämättä tuloksia. Tavoite voidaan saavuttaa parannetulla kokeen suunnittelulla, tilastollisilla analyyseilla sekä jakamalla tietoa ja neuvoja eri tutkimusryhmien ja organisaatioiden kesken. (European Commission 2016; National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research 2016.) Opinnäytetyössä on käytetty vain pieni määrä koe-eläimiä, joista on tutkittu monta eri asiaa, ja näin ollen saatu mahdollisimman paljon tietoa kustakin eläimestä.

2.2.3 Refinement eli parantaminen

Menetelmien parantaminen vähemmän kipua ja kärsimystä aiheuttavaksi tulee huomioida koko eläimen eliniän ajan. Parannuksia voidaan tehdä esimerkiksi eläinten kasvatus- ja säilytysolosuhteita muuttamalla sekä uudistamalla hoito- ja toimenpidemenetelmiä. (Lääninhallituksen eläinkoelautakunta 2016; National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research 2016.)

Opinnäytetyössä on muiden osa-alueiden lisäksi kiinnitetty huomioitu erityisesti hoito- ja toimenpidemenetelmiin. Kokeessa eläimiin asetettavat ihonalaiset implantaatit ovat koko kokeen ajan paikallaan, joten eläimet välttävät esimerkiksi päivittäisten injektioiden aiheuttamasta mahdollisesta kivusta ja stressistä. Implantaatti on myös valmistettu turvallisesta, jo aiemmin kliinisellä puolella käyttöön otetusta materiaalista, joten sen ei odoteta aiheuttavan eläimelle haittavaikutuksia.

2.3 Lääkeaineiden annostelu prekliinisessä tutkimuksessa

Prekliinisessä vaiheessa lääkkeitä annostellaan eläimille useilla eri tavoilla. Lääkeaine annetaan oraalisesti, jos lääkkeen tuotemuodon kehitys on jo pitkällä. Oraalisessa annostelussa eläimen ruokatorveen laitetaan annostelusondi, jonka avulla lääkeaine vapautetaan ruiskusta. Eniten käytetty annostelutapa on kuitenkin injektointi, jossa käytetään neulaa ja ruiskua. Useat injektioinnit aiheuttavat eläimelle stressiä ja sen tilalle onkin kehitetty erilaisia pitkäaikaisia annostelumenetelmiä kuten osmoottiset pumpput, puristepelletit ja polymeeri-implantaatit. (Innovative Research of America 2016; Rissanen et al. 2016; Hrapkiewicz, Colby & Denison 2013.)

2.3.1 Injektiot ja oraaliset annostelut

Injektointi on eniten käytetty nestemäisen lääkeaineen annostelutapa koe-eläimillä. Lisäksi käytetään paljon oraalista annostelua, joka tehdään joko metallisilla tai joustavasta muovimateriaalista valmistetuilla sondeilla. Sondin pää on tylppä, jotta se minimoi ruokatorven ja henkitorven tahattoman lävistyksen riskin. Injektoinnissa käytetään pieniä metallisia neuloja, joiden koko on esimerkiksi rotille tyypillisesti 23–27 G. Erilaisia injektiotapoja ovat nahanalainen (SC), lihaksensisäinen (IM), vatsaontelonsisäinen (IP), ihonsisäinen (ID) ja laskimonsisäinen (IV) injektointi. Esimerkiksi hiirillä ja rotilla on niin pieni lihasmassa, että lihaksensisäinen injektointi pyritään aina mahdollisuuksien mukaan korvaamaan vatsaontelonsisäisellä injektoinnilla. Injektoinnin hyötynä on annoksen täsmällinen ja tasainen annostelumahdollisuus, mutta päivittäinen injektointi aiheuttaa eläimelle stressiä ja mahdollista kipua. Nykyisin on kehitelty erilaisia lääkeaineen annostelumenetelmiä korvaamaan päivittäiset injektiot. (Hrapkiewicz, Colby & Denison 2013, 117; Oulun Koe-eläinkeskus 2015.)

2.3.2 Osmoottiset pumput

Osmoottisilla pumpuilla lääkeaineen annostelu voidaan tehdä subkutaanisti, intramuskulaarisesti tai intraperitoneaalisesti. Lääkeaineen jatkuva vapautuminen perustuu yksinomaan osmoosiin, eli osmoottinen paine työntää annostelevaa sylinteriä laitteen sisällä, eikä laite vaadi esimerkiksi sähkövirtaa.



Kuva 1. Durect Corporationin Alzet-osmoottiset pumput. (Durect Corporation 2016)

Osmoottisen pumpun etuja ovat päivittäisten injektioiden välttäminen sekä mahdollisuus varastoida lääkeaine pumppuun itse joko kiinteässä tai nestemäisessä muodossa. Laitteen puutteita ovat, että pumppua ei voi täyttää uudestaan ja että lääkeannoksen suuruutta ei voi muuttaa kesken käytön. Lisäksi osmoottisen pumpun toiminta riippuu lämpötilasta. Esimerkki prekliinisessä tutkimuksessa käytettävistä pienikokoisista osmoottisista pumpuista ovat Durect Corporationin Alzet-pumput. Näillä pumpuilla lääkeainetta voidaan annostella 0,11–10 µl/h, tasaisesti yhdestä päivästä kuuteen viikkoon. (Hrapkiewicz, Colby & Denison 2013, 118; Herrlich et al. 2012; Zingerman et al. 1997.)

2.3.3 Lääkeainetta vapauttavat matriisit

Puristepelletit

Implantoitavia pellettejä käytetään pitkäaikaiseen lääkeaineannosteluun, jolloin voidaan välttää päivittäiset koe-eläinten injektioinnit. Esimerkki prekliinisessä tutkimuksessa käytettävistä hormonipelleteistä ovat Innovative Research of American puristepelletit.



Kuva 2. Innovative Research of American (IRA) puristepelletit.

Pellettien lääkeaineen vapautumisajat vaihtelevat kolmesta viikosta kolmeen kuukauteen ja yksittäisen pelletin lääkeannoksen suuruudet yhdestä mikrogrammasta kahteensataan mikrogrammaan. (Innovative Research of America 2016.) IRA-pellettien heikkous on lääkeaineen epätasainen vapautuminen, joka johtuu suuresta lääkeaineen alkupurkauksesta ja pellettien ajan myötä tapahtuvasta hajoamisesta, jolloin lääkeainetta pääsee vapautumaan kaikista hajon-

neen pelletin osista. Lisäksi heikkoutena on, että kaikki lääkeaineet eivät sovi puristepellettien matriisiin. (Singh et al. 2008.)

Polymeeri-implantaatit

MedRod on uusi innovaatio, joka vapauttaa lääkeainetta tasaisesti. Tuote on pehmeä ja sylinterin muotoinen implantaatti. MedRodissa lääkeaine on dispergoitu tuotteen ytimeen, elastiseen liukenemattomaan polymeerimatriisiin. Polymeerimatriisi on päällystetty elastisella membraanilla, jonka tarkoitus on säätää annostelun määrää ja annostelun pituutta. Sekä matriisi että membraani ovat kemiallisesti silloittuneita polymeerejä, jotka muodostavat orgaanisiin liuottimiin liukenemattoman elastomeerin.



Kuva 3. MedRod-implantaatti. (PreclinApps Oy 2015.)

Polymeerivalmisteita on käytetty jo kymmenien vuosien ajan kliinisellä puolella ehkäisyvalmisteissa ja ne on todettu turallisiksi ja toimiviksi. MedRodin etuja ovat lisäksi pehmeys, kudossyhteensopivuus, tasainen lääkeaineen vapautuminen ja mahdollisuus poistaa implantaatti myös kesken tutkimuksen.

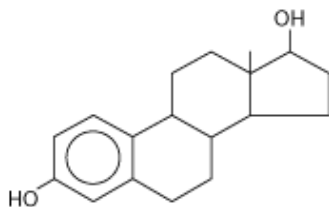
2.4 Estradioli

Estradioli on tärkein luonnollisiin estrogeeneihin kuuluva naishormoni. Estradioli eli 17β -estradioli on myös biologisesti aktiivisin estrogeeni, esimerkiksi estroniin verrattuna noin 10 kertaa tehokkaampi. Estradiolin, kuten muidenkin steroidihormonien, synteessin lähtöaine on kolesteroli. Pääasiassa estradiolia syntyy munasarjoissa, mutta lisäksi tuotantoa on miesten ja naisten lisämunuaiskuo-

ressa, miehillä kiveksissä sekä naisilla istukassa raskauden aikana. (Koulu, Mervaala & Tuomisto 2012, 752; Nienstedt, Hänninen, Arstila, Björkqvist 2014; 444)

2.4.1 Rakenne ja keskeiset vaikutukset

Estradiolin rakenteen runkona on steroidi, jonka aromaattisen renkaan kolmannessa hiiliatomissa on fenolinen hydroksyyli. Tähän hydroksyyliin on yleensä sitoutunut liittjääentsyymi, joka katalysoi vierasaineen liittymistä elimistön omaan molekyyliin, kuten tässä estradioliin. Konjugaatti osallistuu estradiolin aineenvaihduntaan ja helpottaa siten estradiolin poistumista elimistöstä.



Kuva 4. Estradioli. (Tuimala & Tuppurainen 2014)

Rasvaliukoisina molekyyleinä estrogeenit läpäisevät helposti tuma- ja solukalvot. Vaikutus kohdekudoksissa on pääasiassa anabolinen eli kasvua ja uusiutumista lisäävä. Tyttölapsen syntymän jälkeen estrogeenit vaikuttavat munanjohtimien ja emättimen kehittymiseen. Lisäksi estrogeenit osallistuvat sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien muotoutumiseen ja ylläpitämiseen. (Koulu ym. 2012, 750 & 751.)

2.4.2 Estradiolin käyttö prekliinisessä tutkimuksessa

Estradiolia käytetään paljon prekliinisissä tutkimuksissa, sillä estrogeeneilla on vaikutuksia monissa sairauksissa ja normaalissa aineenvaihdunnassa. Keskeisimmät estradiolin käyttökohteet prekliinisessä vaiheessa ovat hormonaalisesti

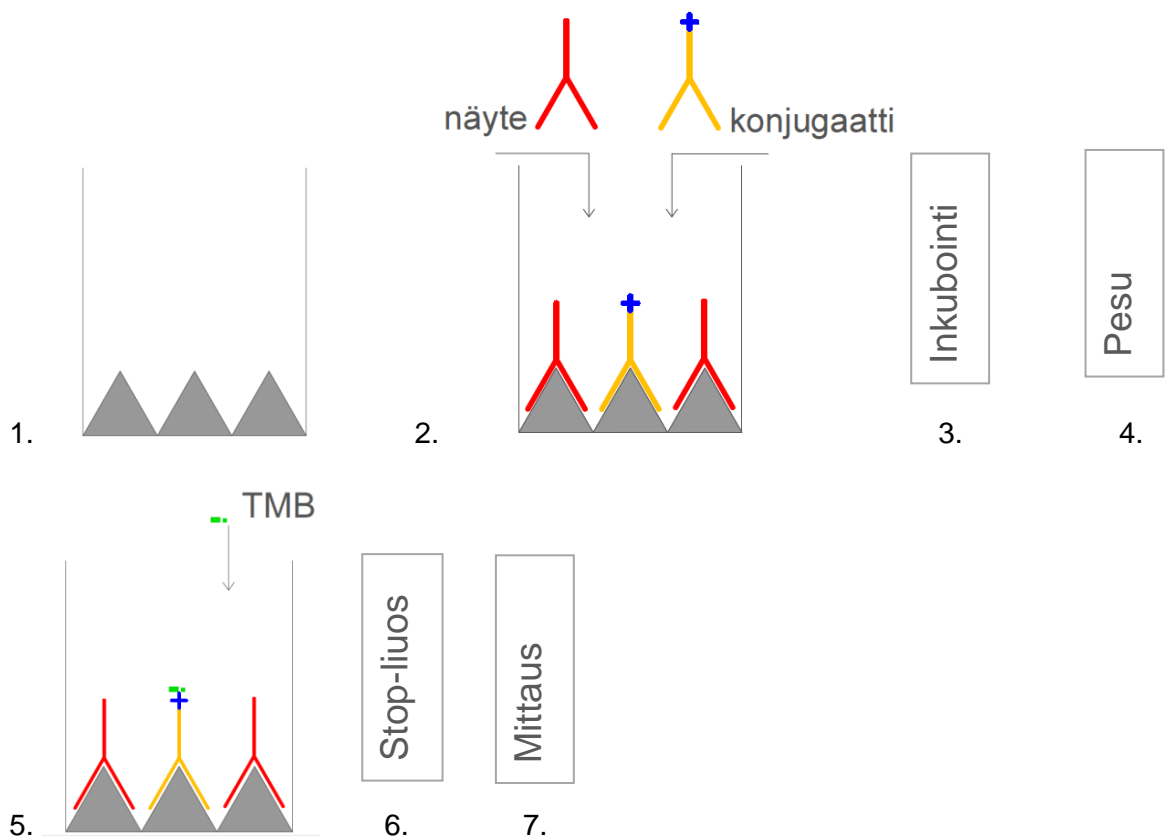
säädelyjen syöpien tutkimukset, kuten rintasyöpätutkimukset. Näissä tutkimuksissa estradiolilääkitys saa estradioliriippuvaisen rintasyövän kasvamaan koe-eläimessä. Estradiolia käytetään paljon myös metaboliatutkimuksissa kuten osteoporoositutkimuksissa. (Indran et al. 2016, Sflomos et al. 2016, Weigt et al. 2015, Chalasani et al. 2014.)

2.5 Estradiolipitoisuuden määrittäminen

Opinnäytetyössä *in vivo* -tutkimuksen veren seeruminäytteiden estradiolikoncentraatiot mitattiin ELISA-immunomääritysmenetelmällä ja dissoluutiokokeen näytteiden estradiolikoncentraatiot HPLC-laitteistolla. Määritys HPLC:llä on tarkempi, mutta olisi ollut haastavaa soveltaa *in vivo* -näytteille.

2.5.1 ELISA-kitti

Opinnäytetyössä mitattiin *in vivo* ja *in vitro* -näytteiden estradiolipitoisuutta Alpcon estradioli ELISA-immunomäärityskitillä. Kitti toimii kilpailevan ELISA-määrityksen perusteella. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on heterogeeninen entsyymi-immunomääritysmenetelmä.

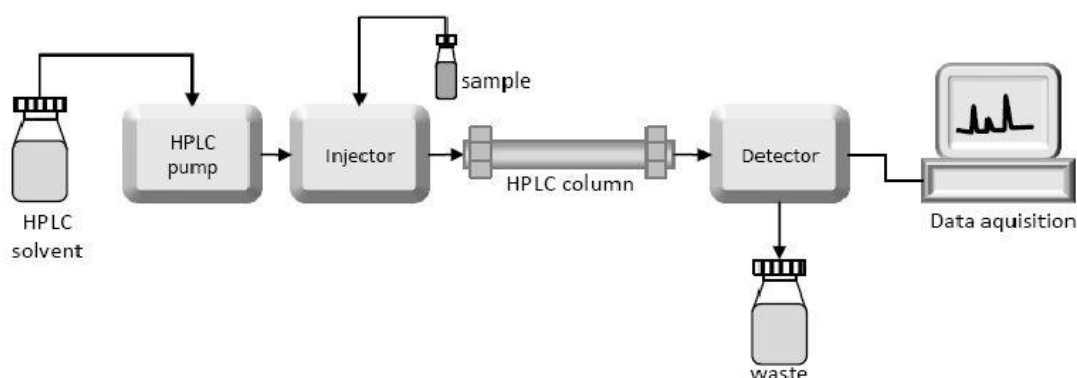


Kuvio 2. Kilpaileva ELISA-määritys.

Yllä olevassa kuviossa on esitetty opinnäytetyössä käytetyn kilpailevan ELISA-määrityksen vaiheet. Tässä menetelmässä näyte ja tietty määrä leimattua vasta-ainetta kilpailevat samanaikaisesti sitoutumisesta kuoppalevyn pohjalle sidottuun antigeeniin (1 ja 2). Näytteen ja entsyymileimatun konjugaatin lisäyksen jälkeen on tunnin inkubointi, jonka aikana sitoutuminen tapahtuu (3). Kuopista poistetaan pesun avulla kaikki sitoutumaton aines, jonka jälkeen lisätään substraattia (TMB) jokaiseen kuoppaan (4 ja 5). Seuraavaksi tapahtuu reaktio, jossa entsyymi katalysoi substraatin, ja syntyy fotometrisesti mitattava värillinen reaktiotuote (5). Ennen mittausta lisätään vielä lopetusliuos, joka pysäyttää reaktion (6). Kilpailevassa määrityksessä mitattu absorbanssilukema on kääntäen verrannollinen yhdisteen pitoisuuteen, jolloin värireaktio on voimakas pienelle pitoisuudelle ja lievä suurelle pitoisuudelle (7). (Penttilä, 2004, 94-95.)

2.5.2 HPLC

In vitro -näytteiden estradiolipitoisuuksia mitattiin ELISA-kitin lisäksi myös HPLC-laitteistolla. HPLC eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia hyödyntää suurta painetta eluentin eli ajoliuoksen kulkuun hienojakoista jauhetta sisältävän kolonnin läpi. Laitteistoon kuuluvat eluenttisäiliö, pumppu, injektor, kolonni ja detektori.



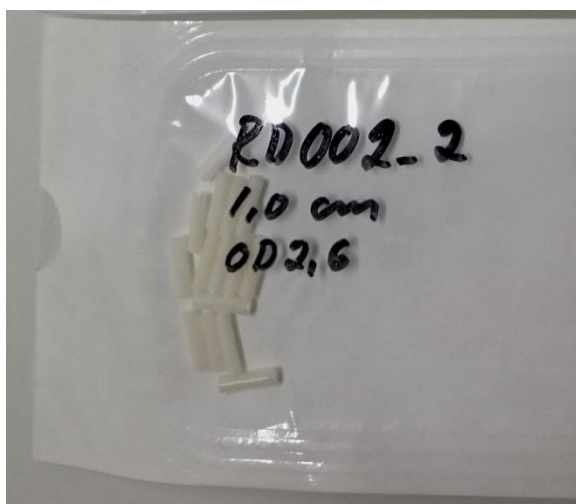
Kuvio 3. HPLC-laitteisto. (Laboratoryinfo 2015)

Näytteen sisältämien eri yhdisteiden erottuminen perustuu aineiden erilaiseen sitoutumiseen kiinteään stationäärifaasiin. Kolonniin tiukemmin sitoutuneet yhdisteet tulevat liikkuvan faasin mukana hitaammin ulos kolonnista kuin heikommin sitoutuneet. Yleisesti kromatografia on erotusmenetelmä, mutta sitä voidaan käyttää myös kvantitatiiviseen analysointiin, kuten tässä opinnäytetyössä on tehty. (Lehtonen & Sihvonen 2004, 147, 152)

3 KOKEELLINEN OSUUS

3.1 Implantaattien valmistus

Opinnäytetyössä testattavien MedRod-implantaattien valmistus on monivaiheinen prosessi. Valmistus aloitetaan punnitsemalla oikea määrä lääkeainematriisin lähtöaineita ja sekoittamalla ne suljetusti sentrifugisekoittimessa. Tämän jälkeen lisätään lääkeaine ja toistetaan sekoitus suljetusti. Seuraavaksi sekoittunut massa injektoidaan teflonpinnoitettuun muottiin, joka siirretään lämpimään uuniin, jossa lääkeainetta sisältävät pitkät sylinterinmuotoiset ydinpalat silloittuivat kemiallisesti elastisiksi lääkeainematriiseiksi. Seuraavaksi palat leikataan halutun pituisiksi ja asetetaan liuottimella turvotetun letkumembraanin sisään.



Kuva 5. Valmiit MedRod-implantaatit sterilointipussissa.

Membraanin kuivumisen jälkeen membraaniaihiot leikataan halutun pituisiksi implantaateiksi. Lopuksi implantaatit vielä pestään, desinfioidaan 70 %:lla etanolilla ja pakataan kuumasaumattuihin sterilointipusseihin.

3.2 Dissoluutiokoe

Dissoluutiotestit kuuluvat lääkekehitykseen. Niiden avulla voidaan kehittää ja valikoida sopivin formulaatio eli lääkkeen tuotemuoto sekä varmistaa eri lääkeerien yhtenäisyys. Dissoluutio on myös testi, joka mittaa lääkkeen *in vitro* -vapautumista ajan funktiona. Tämä voi vaikuttaa valmistusprosessin toistettavuuteen ja joissain tapauksissa myös lääkkeen tehokkuuteen *in vivo*. Opinnäytetyössä dissoluutiotestillä haluttiin tarkkailla ja varmistaa, että lääkeaine vapautuu tasaisesti implantaateista pitkällä aikavälillä sekä selvittää vapautumismäärä. (Wen & Park 2010, 245; Tong et al. 2009; Gad, Tiwary, Sapra & Jain 2008, 484)

Implantaateille tehtiin 60 vuorokauden dissoluutiokoe. Neljästä eri implantaattikoosta oli ensimmäisten 14 vuorokauden ajan kolme rinnakkaista näytettä ja loppuajan jatkettiin yhdellä kunkin koon implantaatilla. Implantit olivat 5 mm ja 10 mm pituisia ja halkaisijaltaan 2,6 tai 3,4 mm. Dissoluutiokoe tehtiin 37 °C:n lämpötilassa, 60 rpm:n sekoituksella. Implantaatit olivat asetettuina keskelle 250 ml:n lasipulloja, noin 2/3 nestepinnan alapuolelle. Dissoluutioväliaineena käytettiin 0,9-prosenttista natriumkloridin vesiliuosta, jota oli kussakin pullossa 200 ml. Näytteitä otettiin alussa 1., 2., 4., 7., 11. ja 14. vuorokauden kohdalla, jonka jälkeen siirryttiin viikon näytteenottoväleihin. Liuokset vaihdettiin neljännen vuorokauden jälkeen jokaisella kerralla näytteenoton yhteydessä, jotta liuenneen estradiolin konsentraatio pysyi niin alhaisena, ettei se hidastanut lääkeaineen jatkuvaa vapautumista.

In vitro -kokeen kaikki näytteet analysoitiin HPLC-laitteistolla. Osa näytteistä analysoitiin myös ELISA-kitillä. HPLC-mittauksia varten etsittiin tietoa aiemmista tutkimuksista, joissa oli määritetty estradiolipitoisuuksia. Artikkeleiden perusteella päädyttiin käyttämään C-18 kolonnia, ja ajoliuoksena veden ja asetonitriilin seosta. C-18 kolonnin sisus on pooliton ja se soveltuu hyvin hydrofobisten yhdisteiden, kuten estradiolin erottamiseen. Lisäksi artikkeleista löytyi eri virtausnopeuden arvoja, injektioilavuuksia sekä mittausaallonpituuksia, joilla estradioli

oli saatu erotettua näytteestä. (Malcolm et al. 2003, Russell et al. 2000 & Woolfson et al. 1999.)

Opinnäytetyössä testattiin useita erikokoisia ja ikäisiä C-18 kolonneja sekä erilaisia ajo-olosuhteita. Aiemmistä tutkimuksista pystyttiin lopulta hyödyntämään suoraan vain ajoliuoksen koostumus ja kolonnin koko. Koostumus oli 50 % MilliQ-vettä ja 50 % HPLC-laatuista asetonitriliä, ja kolonnin koko oli 150 x 4,6 mm. Käytetty kolonni oli Phenomenexin valmistama Luna 3 µm C-18 ja määritykset tehtiin Agilentin 1100-sarjan HPLC-laitteistolla. Konsentraatiomittauksissa käytettiin virtausnopeutena 0,6 ml/min ja mittausaallonpituutena 205 nm. Injektiotilavuus kasvatettiin 40 µl:aan, jotta näytepiikistä saatiin tarpeeksi korkea.

3.3 *In vivo* -koe

Prekliinisessä vaiheessa tehdään *in vitro* -kokeiden lisäksi erilaisia *in vivo* -kokeita koe-eläimillä. *In vitro* -menetelmät ja tietokonemallinnukset eivät useinkaan pysty antamaan yhtä hyviä, monimutkaisen ihmiselimistön toimintaan verrattavia, tutkimustuloksia lääkeaineen todellisista vaikutuksista kuin koe-eläimillä tehtävät tutkimukset. *In vivo* -tutkimukset ovat myös viranomaisten vaatimuksena, kun uusille lääkeaineille tehdään tehokkuus- ja turvallisuustestauksia. (Vela, Maldonado & Hamon 2014, 4; Hrapkiewicz, Colby & Denison 2013, 5)

Opinnäytetyön kahdeksan viikon *in vivo* -kokeet tehtiin kasvuvaiheen ohittaneilla 8 kuukauden ikäisillä naarasrotilla, joilla elimistön oma estrogeenien tuotto on alhainen. Tällöin pystyttiin helpommin havainnoimaan elimistön ulkopuolisen estradiolin vaikutukset. Kokeen avulla saatiin laaja-alaista tietoa estradiolin vaikutuksista ja vapautumismääristä. MedRod-implantaatti steriloidtiin ennen eläimeen siirtämistä upottamalla implantaatti ensin viideksi sekunniksi 70-prosenttiseen etanoliin ja sitten steriiliin saliiniin. Implantaatit asennettiin kevyessä isofluraanianestesiassa. Nukutetun eläimen lapaluiden väliin tehtiin noin 0,5 cm pitkä viilto. Käyttäen tylppiä pinsettejä tehtiin haava-alueen pääpuolelle ihon alle tilaa implantaatille. Implantaatti asennettiin muodostettuun haavatas-

kuun, ja haava suljettiin kudosliimalla. Kokeen aikana seurattiin muun muassa eläinten painon kehitystä, ja otettiin seeruminäytteitä tietyin aikavälein myöhempää estradiolitason mittausta varten. Kokeen lopussa eläimet lopetettiin CO₂-kaasulla ja kudokset preparoitiin talteen.

3.3.1 Eläimen painon kehitys kokeen aikana ja kohdun ja maksan painot kokeen lopussa

Eläinten painoa mitattiin *in vivo* -kokeen aikana viikoittain. Maksan painon muutoksia estradiolihoitoon saaneissa eläinryhmissä verrattiin kontrolliryhmään, jotta saatiin tietoa hormonivaikutuksesta, sekä implantista vapautuvan lääkeaineannoksen turvallisuudesta. Kohtujen painon muutoksia estradiolihoitoon saaneissa eläinryhmissä verrattiin kontrolliryhmään, jotta saatiin lisää tietoa hormonivaikutuksesta.

3.3.2 Seerumin estradiolitasot kittikemialla kokeen aikana

Eläimistä otettiin kokeen aikana eri ajankohtina häntäverinäytteitä, joista sentrifugoitiin 30–60 min seisotuksen jälkeen seerumi erilleen (2500 g, 10 min). Tämän jälkeen seeruminäytteet siirrettiin -70°C:seen pakkaseen odottamaan myöhempää estradiolipitoisuuden määrittystä. Seeruminäytteiden estradiolipitoisuudet analysoitiin estradioli ELISA-kitillä (American Laboratory Products Company, ALPCO, catalog number 11-ESTHU-E01) ja tulokset luettiin Hidexin Sensekuoppalevylukijalla.

3.3.3 Kliiniset havainnot kokeen aikana

Eläimistä tehtiin myös yleisiä kliinisiä havaintoja kokeen aikana. Kokeen lopussa PreclinApps Oy:n tautimallipatologi tutki eläinten kudokset sekä implantointi alueet makroskooppisesti havaitsematta niissä mitään implantin toksisuuteen viittaavia muutoksia, joten kudoksille ei tehty tarkempaa histologiaa.

3.4 Tilastolliset analyysit

Opinnäytetyön dissoluutionäytteille laskettiin tilastollisena analyysina korrelaatio ELISA- ja HPLC-määritysten tulosten välille. *In vivo* -tuloksille tehtiin puolestaan tilastollisena analyysina Studentin T-testit, jossa verrattiin lääkehoidon saaneiden eläimien tuloksia intaktien eläimien tuloksiin.

3.4.1 Korrelaatio

Korrelaatio kuvastaa kahden muuttujan välistä riippuvuutta. Lähellä arvoa 1 olevat tulokset kertovat erittäin merkittävästä positiivisesta korrelaatiosta, ja puolestaan lähellä arvoa -1 olevat tulokset erittäin merkittävästä negatiivisesta korrelaatiosta. Jos tulos on lähellä arvoa 0, muuttujilla ei ole korrelaatiota. Opinnäytetyössä tarkasteltiin ELISA- ja HPLC-määritysten toimivuus estradiolipitoisuusmittauksissa laskemalla korrelaatio dissoluutiokokeen rinnakkaisten näytteiden konsentraatiotuloksista. Vertailumittaukset tehtiin 4., 7., 11. ja 14. päivän näytteille ja korrelaatio laskettiin Microsoftin Excel-ohjelman korrelaatioyhtälöllä. Tuloksista piirrettiin myös korrelaatiokuvaaja, jossa ELISA-määrityksestä saadut tulokset olivat x-akselin arvoina ja HPLC-määrityksen tulokset y-akselin arvoina.

3.4.2 Studentin T-testi

In vivo -kokeen tuloksille tehtiin tilastollisena analyysina Studentin T-testi, jonka avulla voidaan määrittää, eroaako kaksi toisistaan riippumatonta ryhmää tilastollisesti toisistaan. Testeissä verrattiin hoidon saaneiden eläimien tuloksia intaktin eläinryhmän tuloksiin. T-testi tehtiin eläinten punnitustulosten lisäksi myös kohdun ja maksan punnitustuloksille sekä veren seeruminäytteiden tuloksille. T-testin tuloksena saatiin p-arvoja, jotka kertoivat kuinka merkittävä tulos on tilastollisesti.

Taulukko 1. P-arvojen selitykset.

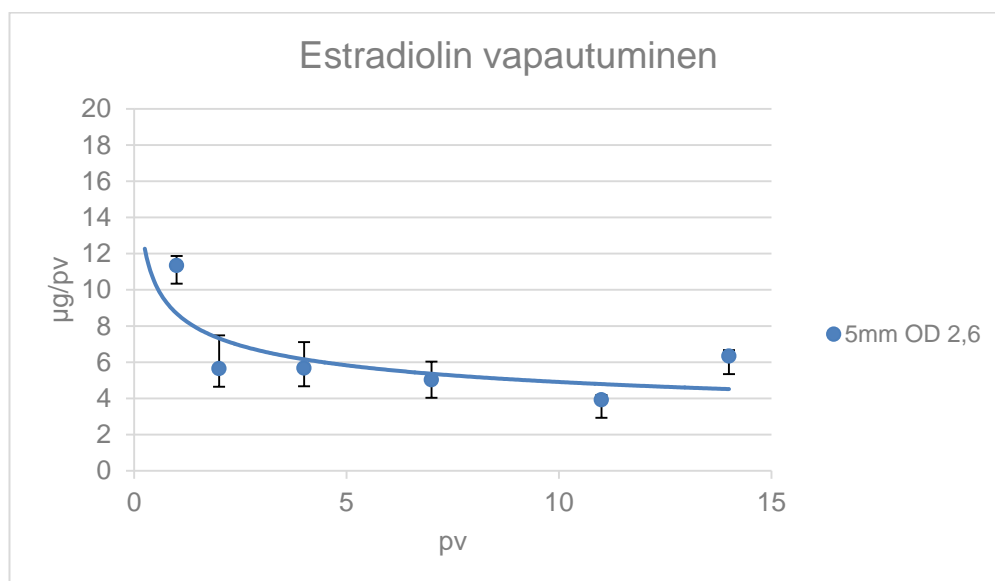
P-arvo	Tilastollinen merkitsevyys	Merkitsevyys
<0,1	lähes merkitsevä	a
<0,05	melkein merkitsevä	*
<0,01	merkitsevä	**
<0,001	erittäin merkitsevä	***

4 TULOKSET

Tässä osiossa on esitetty sekä dissoluutiokokeen että *in vivo* -tutkimuksen tulokset. Lisäksi osiosta löytyy tilastollisten analyysien tulokset.

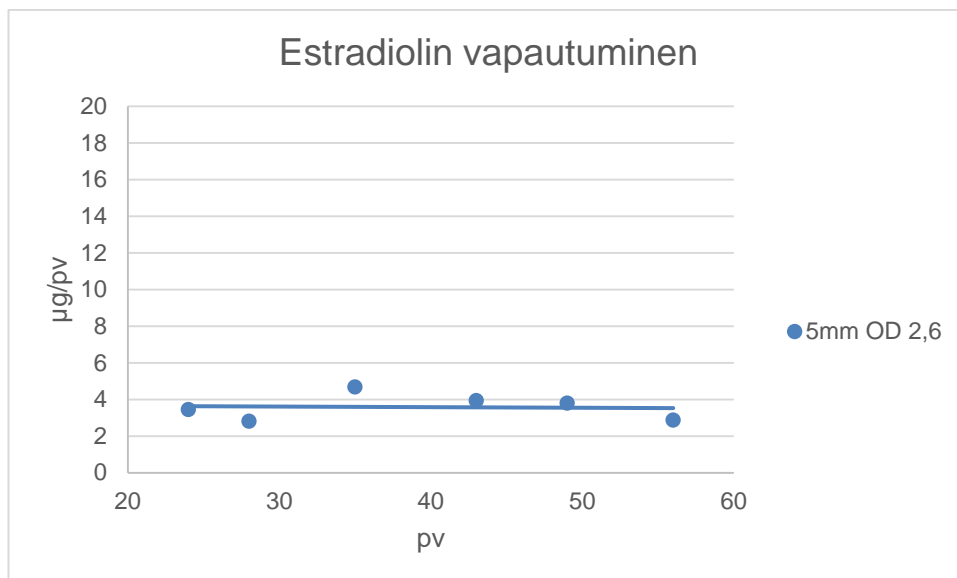
4.1 Dissoluutiokokeen estradiolitasot HPLC:llä kokeen aikana

Dissoluutiokokeen ensimmäisten 14 vuorokauden aikana kokeessa oli kolme rinnakkaista näytettä kustakin neljästä implantaattikoosta. HPLC:llä saatiin määritettyä kunkin näytteen estradiolikonsentraatio, josta laskettiin näytteenoton ajankohdan avulla vapautumisarvot vuorokautta kohden. Alla on esitetty esimerkkikuvaajat pienimmästä implantaattikoosta. Muiden implantaattikokojen vapautumiskuvaajat ovat liitteessä 1.



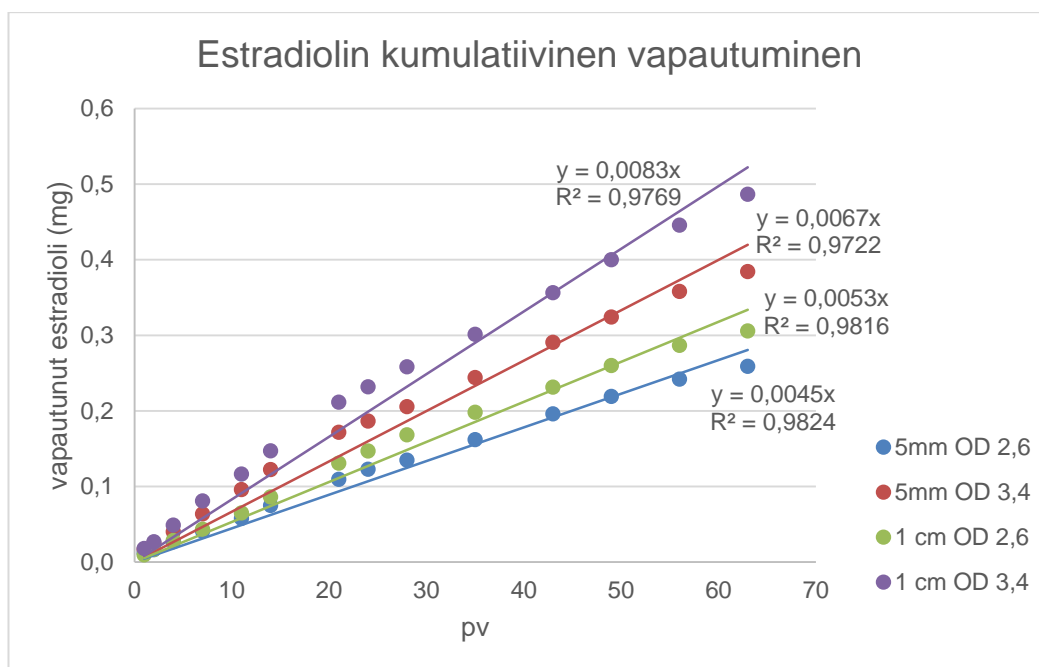
Kuvaaja 1. Estradiolin vapautuminen (µg/pv, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 5 mm OD 2,6 mm), 1–14 vrk

Dissoluutiokoetta jatkettiin 14 vuorokauden jälkeen yhdellä kunkin koon implantaatilla ja tulokset laskettiin samalla tavalla kuin ensimmäisten päivien näytteille.



Kuvaaja 2. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$) implantaatista (pituus 5 mm OD 2,6 mm), 21–56 vrk

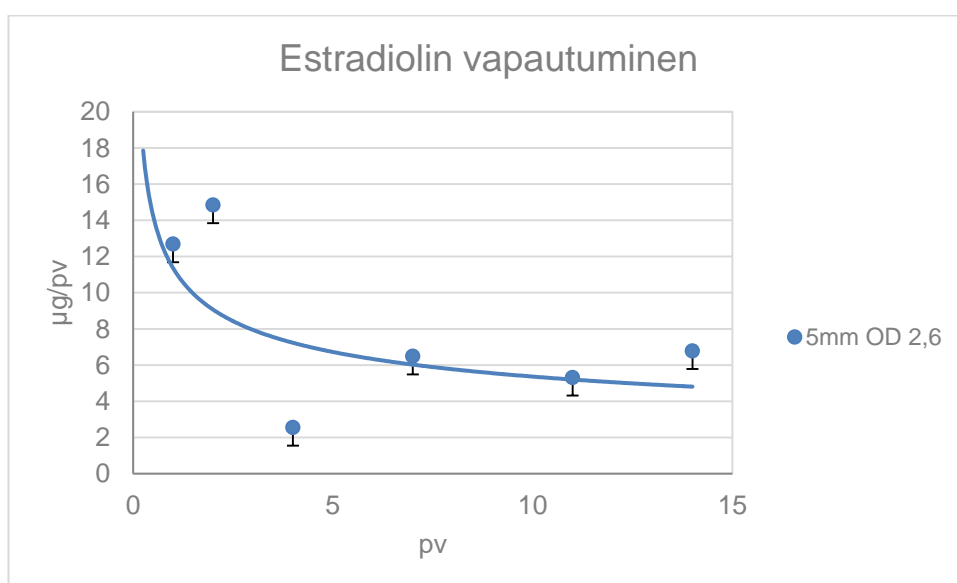
Dissoluutiokokeen implantaateille laskettiin HPLC-määrityksen tuloksista myös kumulatiivinen vapautuminen eli kustakin implantaattikoosta kokeen aikana vapautuneen lääkeaineen määrä milligrammoina.



Kuvaaja 3. Estradiolin kumulatiivinen vapautuminen implantaateista.

4.2 Dissoluutiokokeen estradiolitasot ELISA-kitillä kokeen aikana

Dissoluutiokokeen ensimmäisten 14 vuorokauden näytteet analysoitiin myös estradioli ELISA-määrityksellä. Tulokseksi saatiin kunkin näytteen estradiolikonsentraatio, josta laskettiin näytteenoton ajankohdan avulla vapautumisarvot vuorokautta kohden. Alla on esitetty esimerkkituotteen pienimmästä implantaattikoosta. Muiden implantaattikokojen vapautumiskuvaajat ovat liitteessä 1.



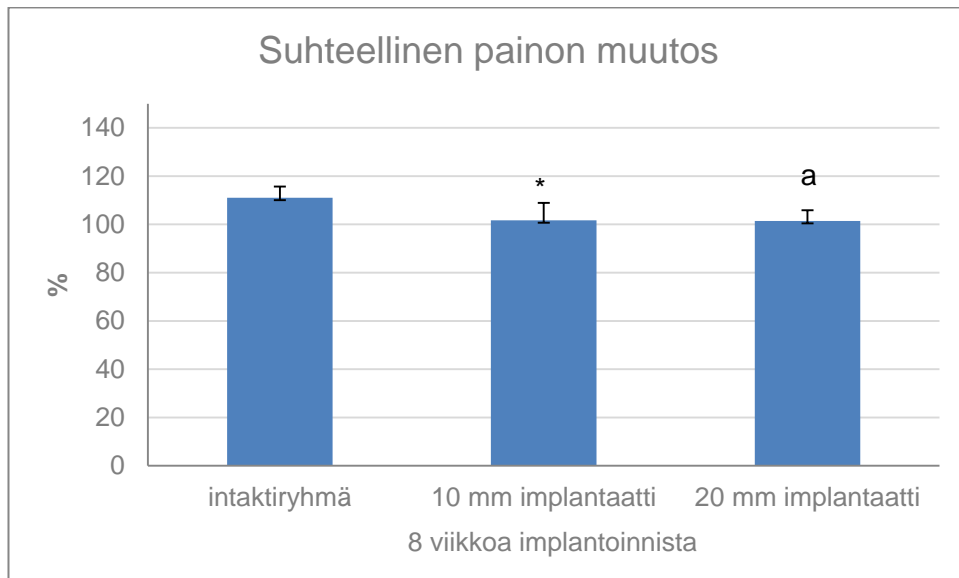
Kuvaaja 4. Estradiolin vapautuminen (µg/pv, keskiarvo ja keskihajonta) implantaattista (pituus 5 mm OD 2,6 mm), 1–14 vrk, ELISA-määritys.

4.3 *In vivo* -kokeen tulokset

Naarasrotilla tehdyssä *in vivo* -kokeessa seurattiin eläinten painon kehitystä, ja määritettiin kohdun ja maksan painot kokeen lopussa. Eläimiltä otettiin myös veren seeruminäytteitä, joista määritettiin estradiolipitoisuus ELISA-kitillä. Alla olevissa kuvaajissa näkyy lisäksi Studentin t-testin tuloksena saadut merkittävyyssarvot tähdillä merkittyinä.

4.3.1 Painon kehitys kokeen aikana

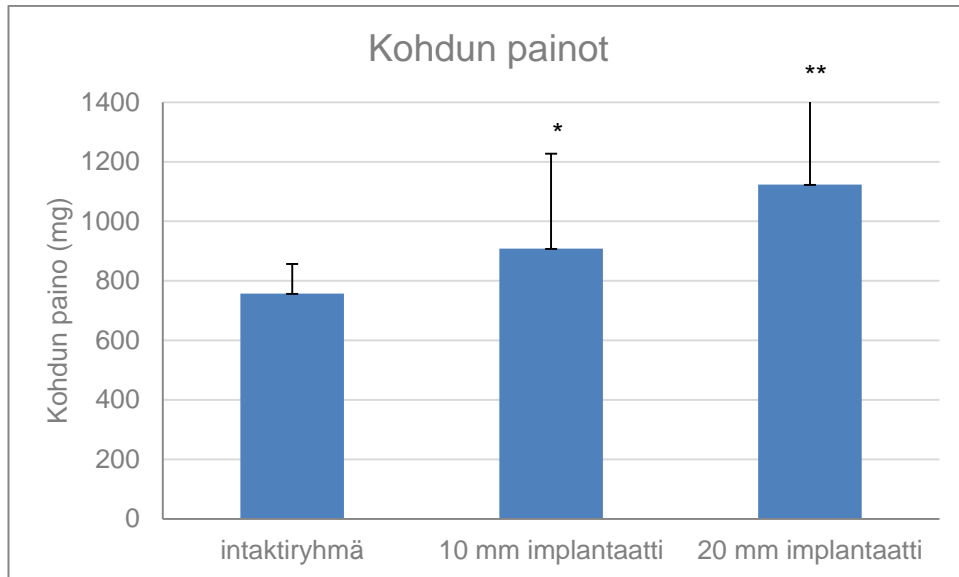
Painotuloksiin on laskettu eläinten suhteellinen painon muutos prosentteina, jossa on verrattu eläimen loppupainoa alkupainoon. Alkupaino on asetettu 100 prosenttiin ja kuvaajassa on esitetty suhteellinen paino kokeen lopussa.



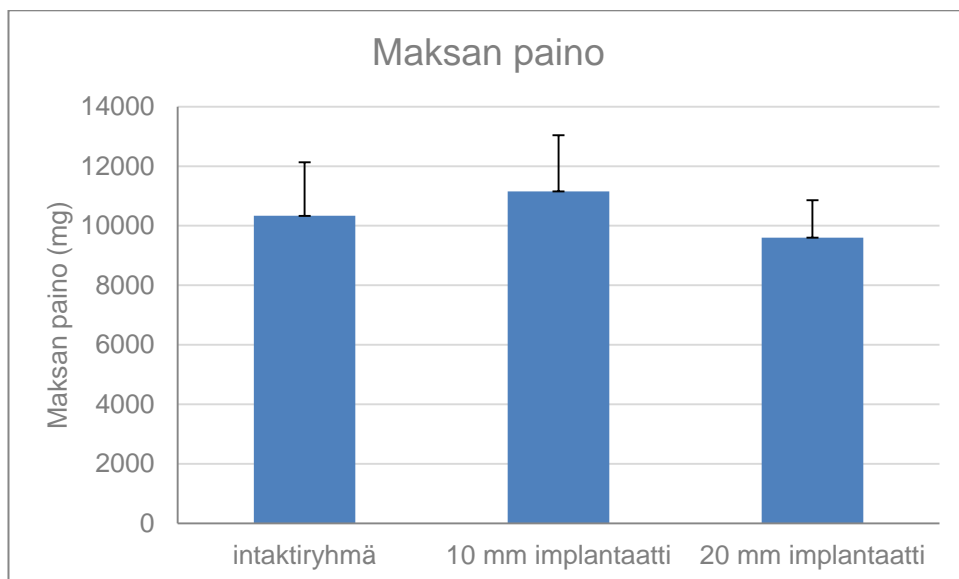
Kuvaaja 5. Eläinten suhteellinen painon muutos (% , keskiarvo ja keskihajonta) *in vivo* -kokeen aikana.

4.3.2 Kohdun ja maksan painot kokeen lopussa

In vivo -kokeen lopussa eläimet lopetettiin ja niiden kohtu sekä maksa preparoitiin talteen. Elimet punnittiin ja alla on esitetty painot kokeen lopussa.



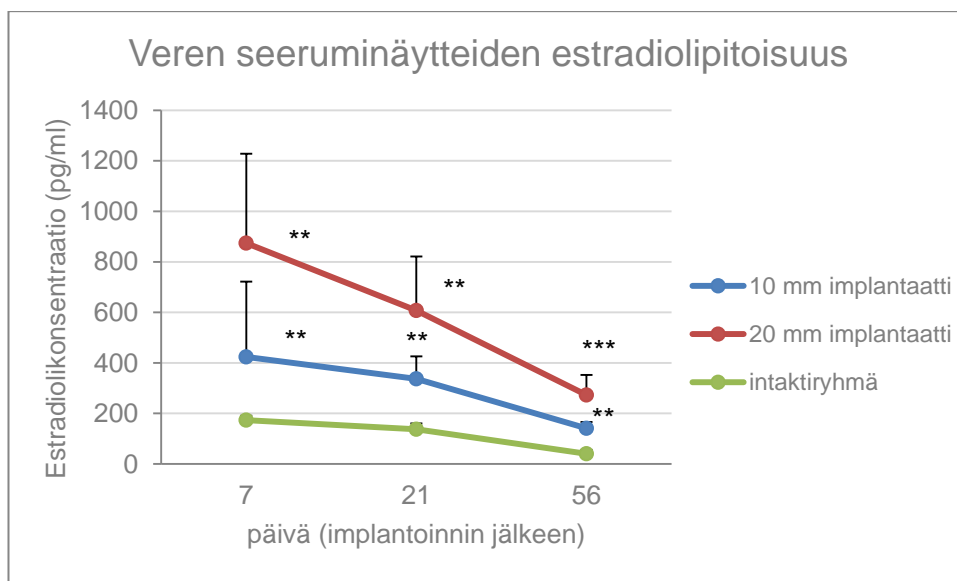
Kuvaaja 6. Eläinten kohdun paino (mg, keskiarvo ja keskihajonta) kokeen lopussa.



Kuvaaja 7. Eläinten maksan paino (mg, keskiarvo ja keskihajonta) kokeen lopussa.

4.3.3 Seerumin estradiolitasot kittikemialla kokeen aikana

Rotilta otettiin kokeen aikana verinäytteet yhden, kolmen ja kahdeksan viikon kohdalla. Veren seeruminäytteiden estradiolipitoisuus määritettiin ELISA-kitillä ja kunkin ryhmän tulokset on esitetty alle olevassa kuvaajassa.



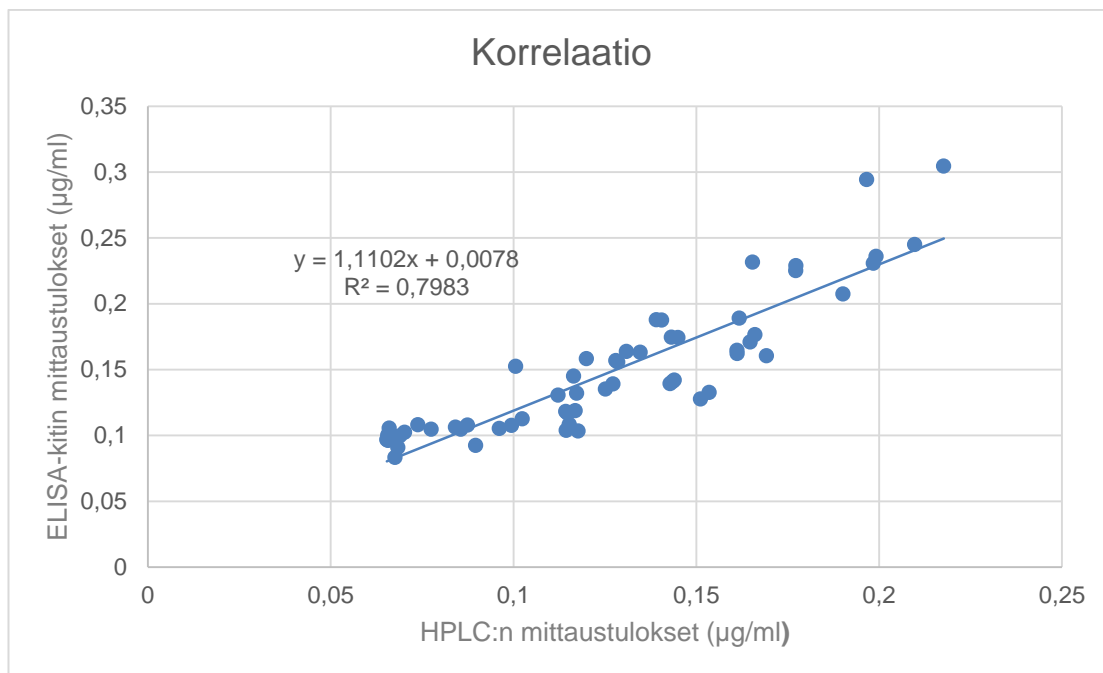
Kuvaaja 8. Seeruminäytteiden estradiolipitoisuus *in vivo* -kokeen aikana.

4.4 Tilastolliset analyysit

Opinnäytetyössä laskettiin korrelaatio ELISA- ja HPLC-määritysten välille rinnakkaisten dissoluutionäytteiden konsentraatitulosien avulla. Lisäksi tilastollisena analyysinä tehtiin Studentin T-testi *in vivo* -kokeen tuloksille, jossa verrattiin lääkehoidon saanutta eläinryhmää intakteihin eläimiin.

4.4.1 Korrelaatio

Dissoluutiokokeen rinnakkaiset mittaustulokset ovat korrelaatiosuoralla vuorokausien 4, 7, 11 ja 14 näytteistä. Kukin tulos on samasta näytteestä ELISA:lla ja HPLC:llä.



Kuvaaja 9. HPLC- ja ELISA-määritysten välinen korrelaatio.

Korrelaatio laskettiin lisäksi Excelin yhtälöllä ja tulokseksi saatiin 0,893, joka on erittäin merkittävä korrelaatio.

4.4.2 Studentin T-testi

T-testien tilastollisesti merkitsevät tulokset ovat näkyvillä *in vivo* -kokeen kuvaajissa tähdillä merkittyinä. Osa T-testin p-arvoista oli suurempia kuin 0,05. Merkintää "a" on käytetty eläinten painon kuvaajassa p-arvosta, joka on <0,1.

Suhteellisessa painon kehityksessä kokeen aikana pienemmän 10 mm implantaatin eläinryhmällä ero intaktiryhmään on tilastollisesti melkein merkitsevä. Isomman 20 mm implantaatin eläinryhmällä ero on tilastollisesti merkitsemättömämpi intaktiryhmään kuin pienemmän implantaatin eläinryhmällä (kuvaaja 5). Pienen ja ison implantaattiryhmän keskiarvot olivat kuitenkin lähes samat ja molempien ryhmien keskiarvot olivat matalampia kuin intaktiryhmän. Kokeen lopussa punnittujen kohtujen paino 10 mm implantaatin eläinryhmällä on tilastollisesti melkein merkitsevä verrattuna intaktiryhmään ja 20 mm implantaatin ryhmällä tilastollisesti merkitsevä ero (kuvaaja 6). Maksan painoissa ei puolestaan

ole T-testillä havaittavia tilastollisia eroja (kuvaaja 7). Tilastollisesti merkitsevä ero on taas puolestaan seeruminäytteiden estradiolipitoisuudessa 10 mm implantaatin eläinryhmän ja intaktiryhmän välillä. Saman määrityksen 20 mm implantaatin tuloksilla on myös tilastollisesti merkitsevä ero intaktiryhmään verrattaessa (kuvaaja 8).

5 POHDINTA

Dissoluutiokokeen 14 ensimmäisen vuorokauden HPLC:n tuloksista nähdään, että lääkeaineen vapautuminen rinnakkaisista implantaateista on hyvin samankaltaista ja että vapautumismäärä tasoittuu kahden ensimmäisen vuorokauden lievän alkupurkauksen jälkeen. Implantaatti g:n suuri vapautumismäärä alussa johtui dissoluutioastian mahdollisesta estradiolijäämästä, mutta tämän implantaatin vapautumislukema tasoittui heti ensimmäisen liuoksen vaihdon jälkeen. Dissoluutiokoea jatkettiin 14 vuorokauden jälkeen yhdellä kunkin koon implantaatilla, koska rinnakkaisten implantaattien vapautumiskuvaajat olivat hyvin samankaltaiset. Estradiolin kuvaajista nähdään, että lääkeaineen vapautuminen implantaateista jatkuu tasaisena myös 21 vuorokauden jälkeen.

Pienet vaihtelut vapautumismäärässä voidaan perustella mittalaitteiston ja käyttäjän mahdollisilla epätarkkuuksilla. HPLC-laitteiston kolonnin iästä ja kunnosta ei ollut etukäteen tarkkaa tietoa. Kolonni toimi tasaisesti koko kokeen ajan, mutta sen erotuskyky saattaa olla heikentynyt verrattuna uuteen kolonniin. Yksi virhelähde on myös kesken dissoluutiokokeen kaksi kertaa noin vuorokauksi pysähtynyt dissoluutiolaitteen sekoitus. Pysähdykset olivat 28 ja 35 vuorokauden näytteiden kohdalla, ja tuloksissa voidaan havaita pieni lasku vapautumismäärissä. Lisäksi tulosten tarkkuus ja oikeellisuus olisi mahdollisesti ollut vielä parempi, jos koko dissoluutiokokeen ajan mukana olisi ollut kolme rinnakkaista näytettä. Tuloksiin on saattanut vaikuttaa myös näytteiden liiallinen valonsaanti, sillä estradioli hajoaa helposti valossa. Dissoluutiokoe suoritettiin pimeässä ja näytteet olivat valoisassa vain mittauksen ajan, joten tämän virhelähteen merkitys tuloksiin on pyritty minimoimaan. Mittausten tekijä on myös yleisesti pyrkinyt työskentelemään tarkasti, jotta tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia.

Dissoluutiokokeen HPLC:llä mitatuista arvoista piirrettiin myös kumulatiivisen vapautumisen kuvaajat. Kullakin implanttikoolla lääkeaineen kokonaisvapautumismäärä kasvaa tasaisesti ajan myötä. Kuvaajasta nähdään myös, että pienimmän (pituus 5 mm, halkaisija 2,6 mm) implantaatin vapautumismäärä on kaikissa aikapisteissä suunnilleen puolet isoimman (pituus 10 mm, halkaisija 3,4

mm) implantaatin vapautumismäärästä. Kuvaajat on piirretty Microsoft Excelillä, jonka käyränsovitusmallit eivät olleet täysin optimaalisia dissoluutiokokeen tuloksille. Piirto-ohjelmana käytettiin Exceliä, sillä käytössä ei ollut juuri dissoluutiokokeelle tehtyä piirto-ohjelmaa.

Ensimmäisten 14 vuorokauden ELISA-määrittelyn vapautumiskuvaajat ovat samankaltaisia kuin HPLC:n tuloksista piirretyt kuvaajat. Lääkeaineen vapautumismäärä tasoittuu ensimmäisten päivien jälkeen ja on lähes samalla tasolla kuin HPLC:llä mitattuna. Implantaatti g:n alkupäivien korkea vapautumismäärä johtuu aiemmin esitetystä astian kontaminaatiosta. Yleisesti mahdollisia virhelähteitä ELISA-määrittelylle ovat pienet pipetointilavuudet (50 µl), joissa jo pienikin ilmakupla vaikuttaa pipetointilavuuteen sekä estradiolin valoherkkyys. Nämä virhelähteet on pyritty minimoimaan huolellisilla pipetoineilla sekä pitämällä näytteitä valoisassa vain hetkellisesti mittauksen aikana.

Eläinten painon suhteelliset muutokset kokeen aikana ovat pieniä kaikilla ryhmillä (kuvaaja 5). Lääkehoidon saaneiden eläimien painon suhteellinen muutos on pienempi kuin kontaktiryhmän eläimillä. Estradiolihoito vähentää eläimillä rasvaa, jolloin paino laskee.

Eläinten kohdun painon kuvaajasta 6 nähdään, että lääkehoidon saaneiden eläinten kohdun painot ovat kokeen lopussa suuremmat kuin intaktien, ilman lääkehoitoa olleiden eläinten. Myös implantin koko on vaikuttanut kohdun painoon. Eläimillä, joilla oli 20 mm implantaatti, on lopussa suurempi kohdun paino kuin 10 mm implantaatin eläimillä. Kohtu on hormonisensitiivinen kudokseksi, joten kohdun painon nousu todistaa estradiolin anabolisen vaikutuksen.

Maksan painon kuvaajasta 7 puolestaan nähdään, että lääkehoidon saaneiden eläinten maksojen painot eivät eroa merkittävästi intaktin ryhmän maksojen painoista. Tämän perusteella voidaan todeta, että lääkehoito ei ole aiheuttanut toksisia vaikutuksia, jotka näkyisivät maksan painon nousuna. Lisäksi tautimallipatologi tutki eläinten kudokset eikä havainnut niissä mitään toksisia muutoksia, joten MedRodien voidaan todeta toimineen turvallisesti tässä kahdeksan viikon kokeessa terveillä naarasrotilla.

Veren seeruminäytteiden estradiolipitoisuuden kuvaajassa 8 estradiolipitoisuus kasvaa lääkehoidon saaneilla eläimillä ensimmäisen viikon aikana, jonka jälkeen estradiolitaso tippuu tasaisesti seuraavan seitsemän viikon aikana. Intaktin eläinryhmän endogeeninen estradiolipitoisuus pysyy melko tasaisena, mutta laskee myös hiljalleen kokeen aikana. Kuvaajasta nähdään, että MedRod-implantaatti on toiminut ja vapauttanut estradiolia vereen lääkehoidon saaneille eläimille, sillä intaktin eläinryhmän endogeeninen estradiolitaso on huomattavasti matalampi. Lisäksi nähdään, että isommasta 20 mm:n implantaatista on vapautunut suunnilleen kaksinkertainen määrä estradiolia verrattuna pieneen 10 mm:n implantaattiin. Samankaltaiset erot vapautumismäärässä havaittiin myös dissoluutiokokeessa *in vitro*. Veren seeruminäytteiden estradiolipitoisuuden mittauksissa ELISA-kitillä on mahdollisena virhelähteenä pienet pipetointimäärät sekä seeruminäytteiden käsittely. Opinnäytetyössä on pyritty minimoimaan virhelähteiden vaikutus tuloksiin huolellisella pipetoinnilla ja sulattamalla seeruminäytteet vain lyhyeksi ajaksi analysointia varten. Lisäksi mahdollisia virhelähteitä ovat estradiolin sitoutuminen seerumin proteiineihin ja kudoksiin, ja epävarmuus siitä, pystyikö ELISA-kitti mittaamaan kaikkea estradiolia näytteestä.

Dissoluutiokokeen ensimmäisten 14 vuorokauden ELISA- ja HPLC-määritysten tuloksille tehtiin tilastollisena analyysinä korrelaatiovertailu. Määritysten välinen korrelaatio oli hyvä, joten molempien määritysten voidaan todeta antavan luotettavia tuloksia. Dissoluutiokokeen näytteet päädyttiin analysoimaan HPLC:llä, sillä määrittelykselle valmistettiin kontrolliksi tunnettu määrä estradiolia sisältävä näyte, joka varmisti HPLC-määrittelyn ajo-olosuhteet oikeiksi estradiolin kvantitoimiselle.

Kaikille *in vivo* -kokeen tuloksille tehtiin Studentin t-testit, jossa verrattiin lääkehoidon saaneiden eläinten tuloksia intaktin eläinryhmän tuloksiin. T-testin tulokset ovat näkyvillä *in vivo* -kuvaajissa tähdillä merkittyinä, ja edellä on esitetty perusteluja tilastollisiin eroihin lääkehoidon saaneiden ja intaktin kontrolliryhmän välillä.

6 LOPPUPÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön lopputuloksena saatiin sekä *in vitro*- että *in vivo* -testauksien perusteella varmistus MedRod-implantaattien luotettavasta ja vakaasta toiminnasta. E2-tasot nousivat tasaisesti *in vivo* -tutkimuksen aikana ja samankaltaiset vapautumisprofiilit havaittiin myös *in vitro*.

Implantaatin lääkeaineen alkupurkaus on melko lievä, ja se tapahtuu ensimmäisten päivien aikana, jonka jälkeen vapautuminen on hyvin tasaista jopa useiden kuukausien ajan. *In vivo* -kokeiden perusteella tuotteen voidaan todeta olevan myös turvallinen, sillä implantaatti ei aiheuttanut tutkituille eläimille toksisia tai muitakaan sivuvaikutuksia. Lisäksi *in vivo* -tutkimuksessa naarasrottien kohtujen painot kasvoivat, joka todentaa lääkeaineena käytetyn estradiolin todella vapautuneen implantaateista. Tuotteen etuja ovat lisäksi steriloitavuus sekä mahdollisuus poistaa tuote myös kesken tutkimuksen.

In vivo -näytteet mitattiin estradioli ELISA-kitillä, jonka toiminta varmistettiin määrittämällä *in vitro* -näytteiden estradiolipitoisuudet sekä ELISA-kitillä että HPLC:llä. Kahden määrittelyn välinen korrelaatio oli hyvä, joten menetelmien voidaan todeta mitanneen samaa muuttujaa.

MedRod™-teknologia tarjoaa vakaan, luotettavan, helppokäyttöisen ja kustannustehokkaan vaihtoehdon lääkeaineiden pitkäaikaiseen annosteluun prekliinissä tutkimuksessa. MedRodia käyttämällä voidaan välttää toistuvat eläinten injektoinnit, ja täten tuote mahdollistaa myös eläinten eettisemmän käsittelyn 3R-periaatteen mukaisesti. Tuotetta voidaan käyttää sekä turvallisuus- että tehokkuustutkimuksissa tai tulevaisuudessa ehkä myös eläinlääkkeiden annostelussa.

LÄHTEET

Chalaslani, P.; Stopeck, A.; Clarke, K. & Livingston, R. A pilot study of estradiol followed by exemestane for reversing endocrine resistance in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *The oncologist*. 2014,1127

Durect Corporation. Viitattu 7.3.2016. <http://www.alzet.com/>

Euroopan komissio Ympäristö 2016. Animals used for scientific purposes. Viitattu 15.2.2016 http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/alternative_en.htm

European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations 2016. Animal welfare: 3R's - Replace, Refine, Reduce. Viitattu 15.2.2016 <http://www.efpia.eu/documents/41/90/Animal-welfare-3R-39-s-Replace-Refine-Reduce>

Finnmedi 2005. Vapaaehtoinen ja valistunut - Mukana lääketutkimuksessa. Viitattu 15.2.2016 http://finnmedi-com-bin.aldone.fi/@Bin/4a7c1d7386dd990992eebb30d4f8b21b/1455541621/application/pdf/60979/Laaketietokeskus_Vapaaehtoinen%20ja%20valistunut.pdf

Gad, S. C.; Tiwary, A. K.; Sapra, B. & Jain, S. 2008. *Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties*. Wiley

Herrlich, S.; Spieth, S.; Messner, S. & Zengerle, R. 2012. Osmotic micropumps for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 64, 1618, 1622 & 1626

Holt, J. D. S. & Nuttall, J. P. 2014. Preclinical Safety Evaluation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 383, 2014, 55.

Hrapkiewicz, K.; Colby, L. & Denison, P. 2013. *Clinical laboratory animal medicine: an introduction*. John Wiley & Sons

Indran, I. R.; Liang, R. L. Z.; Min, T. E. & Yong, E-L. Preclinical studies and clinical evaluation of compounds from the genus *Epimedium* for osteoporosis and bone health. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016

Innovative research of America. Viitattu 7.3.2016 <http://www.innovrsrch.com/>

Kinesis Pharma 2016. Nonclinical (Preclinical) Development. Viitattu 15.2.2016 <http://www.kinesis-pharma.com/non-clinical.html>

Koulu, M.; Mervaala, E. & Tuomisto, J. 2012. *Farmakologia ja toksikologia*. Kuopio: Kustannusosakeyhtiö Medicina

Laboratoryinfo 2015. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. Viitattu 28.3.2016 <http://laboratoryinfo.com/hplc/>

Lehtonen, P. O. & Sihvonen, M-L. 2004. *Laboratorioalan analyttinen kemia*. Helsinki: Opetushallitus

Lääninhallitus Eläinkoelautakunta 2016. Luvat eläinkokeiden tekemiseen. Viitattu 15.2.2016 <http://www.laanhallitus.fi/lh%5Cetela%5Chankkeet%5Cellapro%5Chome.nsf/pages/65C2193C7A12BBDAC225728A00472657?opendocument>

National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research 2016. The 3Rs. Viitattu 15.2.2016 <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>

News Medical 2014. What Does Efficacy Mean? Viitattu 31.3.2016 <http://www.news-medical.net/health/What-Does-Efficacy-Mean.aspx>

Nienstedt, W.; Hänninen, O.; Arstila, A. & Björkvist, S-E. 2014. Ihmisen fysiologia ja anatomia. Helsinki: Sanoma Pro Oy

Orion 2016. Lääkekehitys. Viitattu 15.2.2016 <http://www.orion.fi/tutkimus/laakekehitys/>

Oulun Koe-eläin keskus 2015. Aineiden annostelu. Viitattu 1.4.2016 <http://www.oulu.fi/keks/node/13640>

Penttilä, I. & Halonen, T. 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö

Rissanen, J.; Ruohonen, S. & Jukarainen, H. 2016. Novel Long Term Substance Delivery Method in Chronic Dosing Studies. The FASEB Journal.

Salonen, R. 2014. Lääkekehitys eilen, tänään ja huomenna. Sic!-lehti. Vol. 4

Schou, J.; Pelkonen, O. & Saano, V. Päämääränä lääkehoidon turvallisuus. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 11/1996

Sflomos, G.; Dormoy, V.; Metsalu, T.; Jeitziner, R.; Battistar, L.; Scabia, V.; Raffoul, W.; Delaloye, J-F.; Treboux, A.; Fiche, M.; Vilo, J.; Ayyanan, A. & Briskin, C. A Preclinical Model for ER α -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response. Cancer cell. 2016, 407

Singh, M.; Sumien, N.; Kyser, C. & Simpkins, J. W. Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us. Frontiers in Bioscience. 2008, 4, 5

Southern Research Institute 2013. Basic Overview of Preclinical Toxicology Animal Models. Viitattu 15.2.2016 <https://www.uab.edu/medicine/adda/images/131205%20Tox%20Animal%20Models.pdf>

The International Conference on Harmonisation 1998. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Statistical Principles for Clinical Trials. Viitattu 31.3.2016 http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E9/Step4/E9_Guideline.pdf

The Research Quality Association 2012. Regulatory Roadmap for the development of human medicinal Products – Pre-Clinical Testing. Viitattu 15.2.2016 <http://www.therqa.com/regulatory-roadmap/pre-clinical-testing/>

Tong, C.; Lozano, R.; Mao, Y., Mirza, T. & Löbenberg, R. 2009. The Value of In Vitro Dissolution in Drug Development: A Position Paper from the AAPS In Vitro Release and Dissolution Focus Group. Pharmaceutical Technology. Vol. 33, pages 52 & 64

Tuimala, R. & Tuppurainen, M. 2014. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia: Estrogeenien synteesi ja vaikutukset. Duodecim

U.S Food and Drug Administration 1997. Guidance for Industry S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Viitattu 15.2.2016 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074957.pdf>

U.S. Food and Drug Administration 2015. The Drug Development Process – step 2: Preclinical Research. Viitattu 15.2.2016 <http://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/ucm405658.htm>

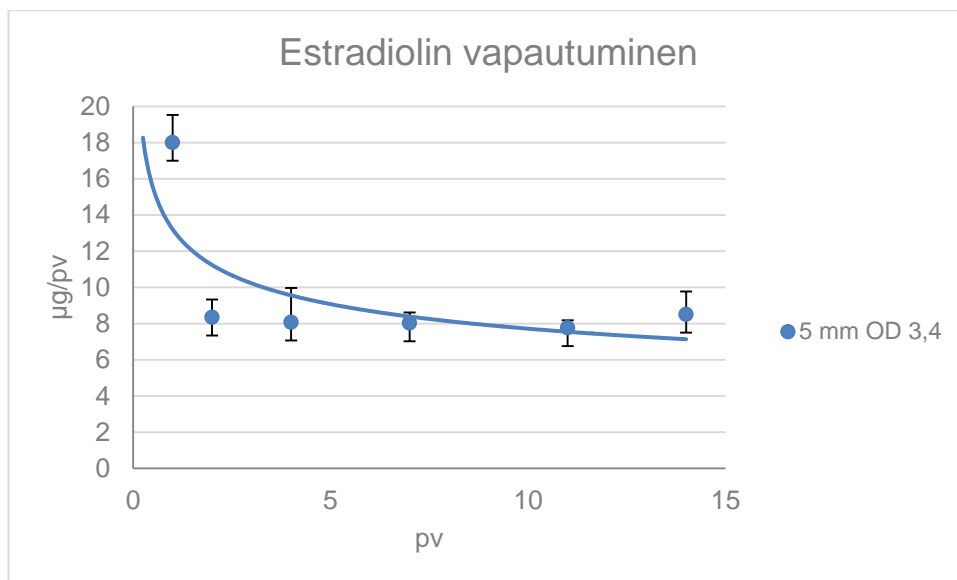
Vela, J. M.; Maldonado, R. & Hamon, M. 2014. Methods and principles in medicinal chemistry, 62: In vivo models for drug discovery. Wiley-VCH

Weigt, C.; Hertrampf, T.; Flenker, U.; Hülsemann, F.; Kurnaz, P.; Fritzemeier, K. H. & Diel, P. Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2015, 12

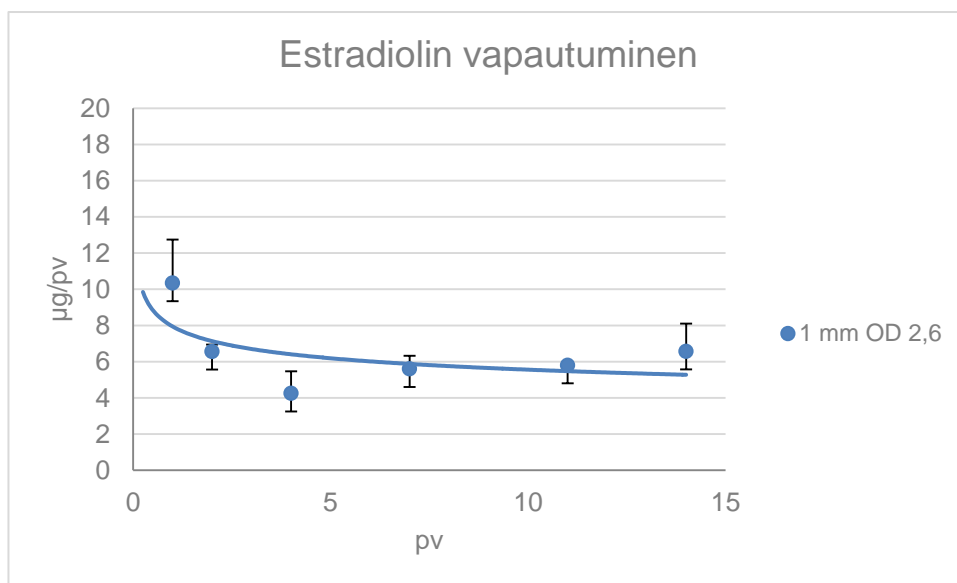
Wen, H. & Park, K. 2010. Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery. Wiley

Zingerman, J. R.; Cardinal, J. R.; Chern, R. T.; Holste, J.; Williams, J.B.; Eckenhoff, B. & Wright, J. The in vitro and in vivo performance of an osmotically controlled delivery system — IVOMEC SR® bolus. Journal of Controlled Release. Vol. 47, 2

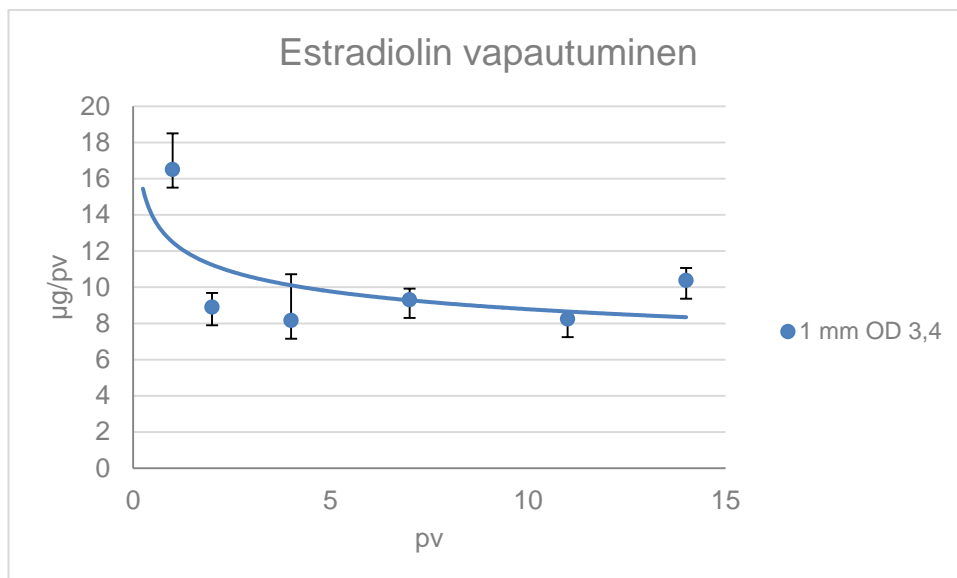
Estradiolin vapautuminen implantaatista *in vitro* -kokeen aikana



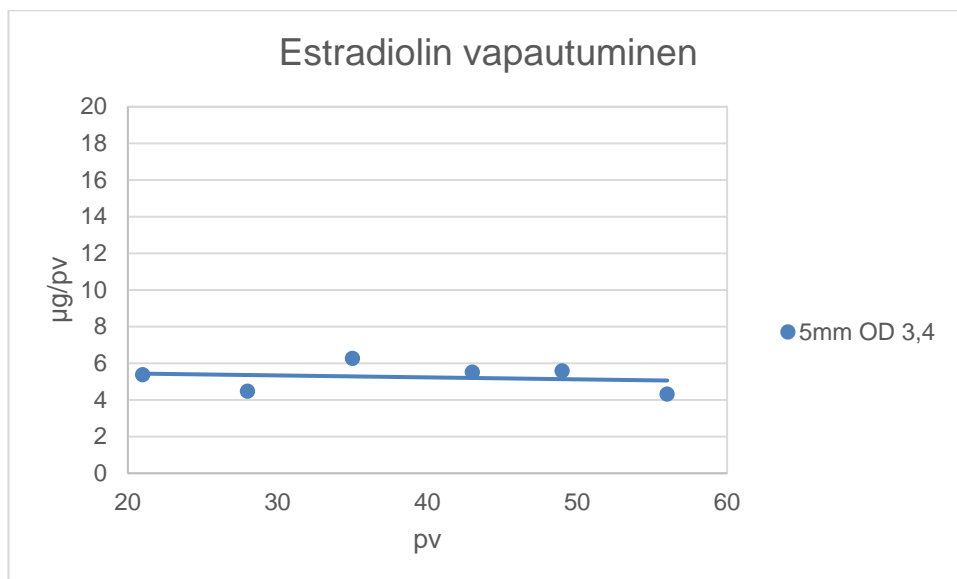
Kuvaaja 10. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 5 mm OD 3,4 mm), 1–14 vrk



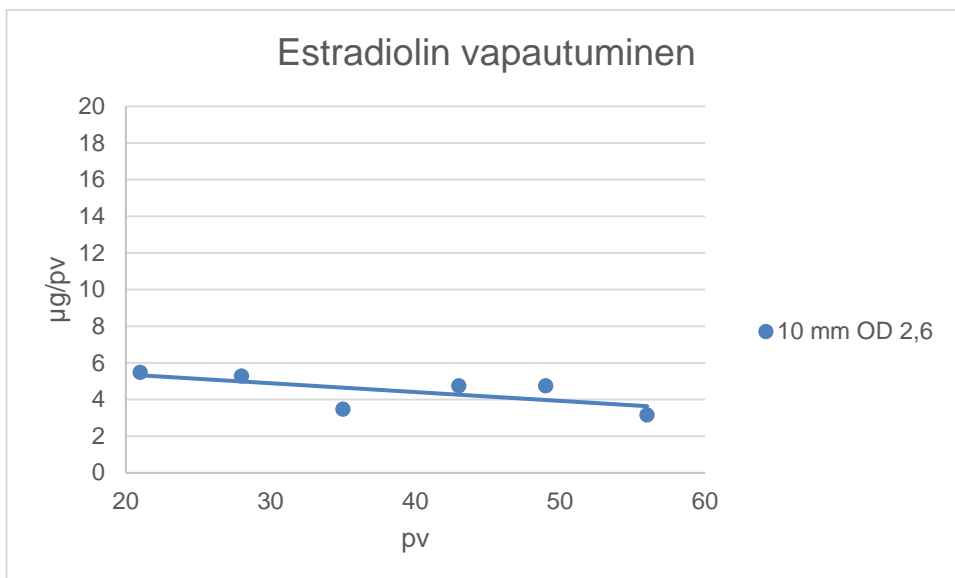
Kuvaaja 11. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 10 mm OD 2,6 mm), 1–14 vrk



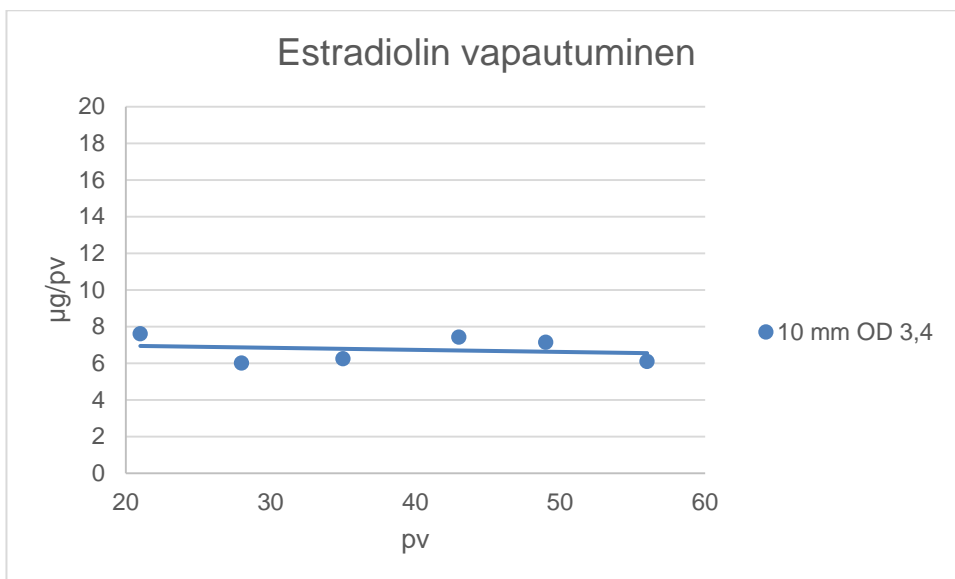
Kuvaaja 12. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 10 mm OD 3,4 mm), 1–14 vrk.



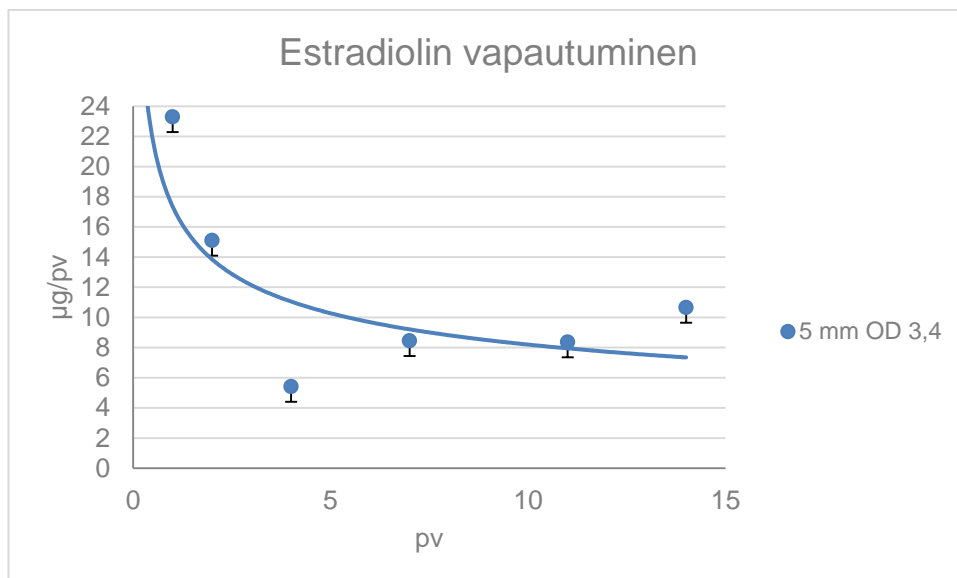
Kuvaaja 13. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$) implantaatista (pituus 5 mm OD 3,4 mm), 21–56 vrk



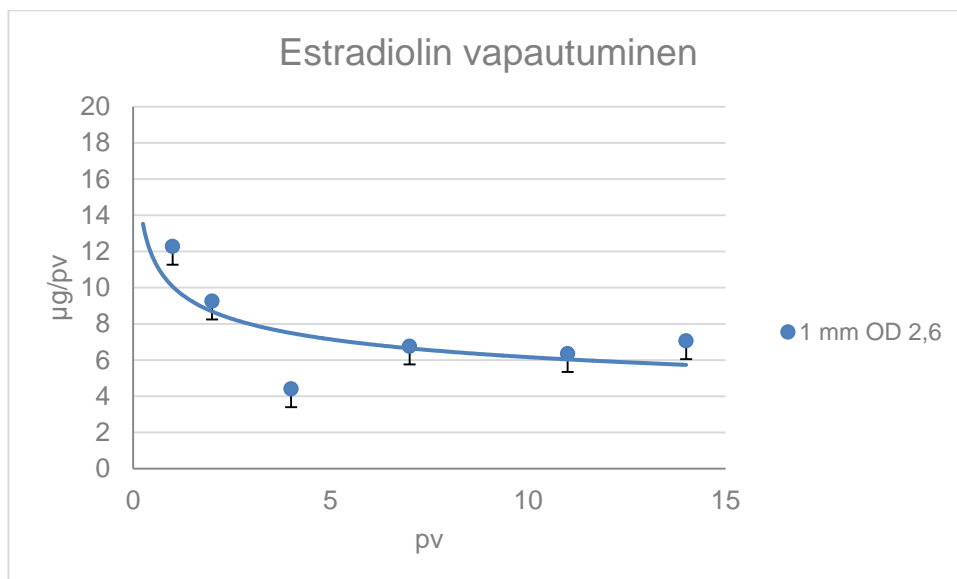
Kuvaaja 14. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$) implantaatista (pituus 10 mm OD 2,6 mm), 21–56 vrk



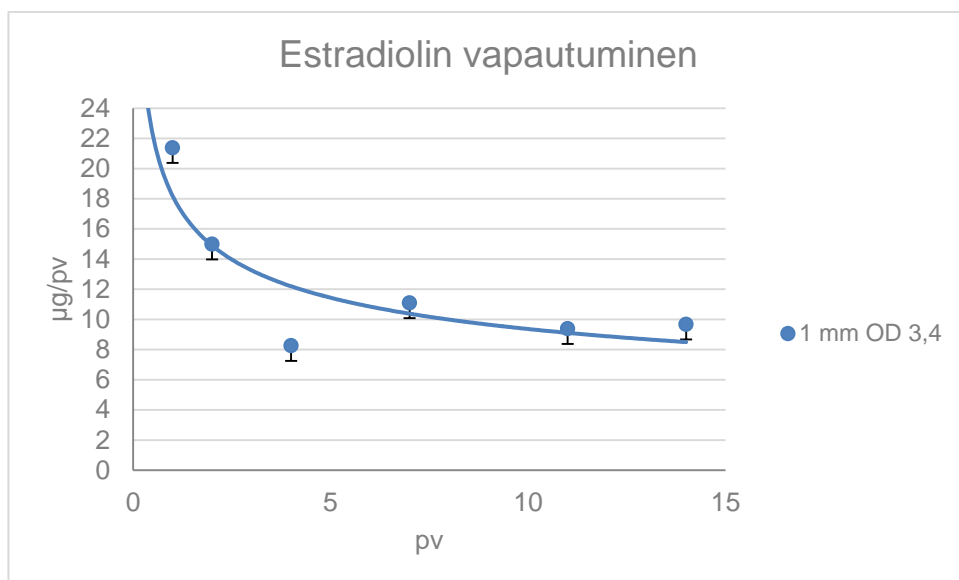
Kuvaaja 15. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$) implantaatista (pituus 10 mm OD 3,4 mm), 21–56 vrk.



Kuvaaja 16. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 5 mm OD 3,4 mm), 1–14 vrk, ELISA-määritys.



Kuvaaja 17. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 10 mm OD 2,6 mm), 1–14 vrk, ELISA-määritys.



Kuvaaja 18. Estradiolin vapautuminen ($\mu\text{g/pv}$, keskiarvo ja keskihajonta) implantaatista (pituus 10 mm OD 3,4 mm), 1–14 vrk, ELISA-määritys.

Posteri

Novel long term substance delivery method in preclinical osteoporosis studies

Jukka Rissanen^{1,2}, Laura Jakobsson³, Saku Ruuhonen³, Harri Jukarainen¹

¹Preclinapps Ltd, Turku, Finland, (info@preclinapps.com)

²Pharmatest Services Ltd, Turku, Finland

³Turku University of Applied Sciences, Turku, Finland

INTRODUCTION

Chronic dosing of compounds often has a pivotal role in preclinical efficacy and toxicology studies as the study length can be several months. To avoid challenges with traditional injections, we have developed a polymer-based substance delivery system called MedRod™. Polymer technology enables stable drug release from weeks to several months in either *in vitro* or *in vivo* preclinical studies. The delivery system is elastic, and it utilizes biocompatible biostable soft matrix that remains unchanged in tissue. It is removable at any time of the study if sudden termination of drug delivery is desired.

AIM OF THE STUDY

The similarities in pathophysiologic responses between the rat and human skeleton have made the rat a valuable model in osteoporosis research. Preclinical osteoporosis studies with rat are often at least 8 week studies or even up to one year. In this study, we characterized the *in vitro* and *in vivo* release of 17 β -estradiol (E2) from MedRod™ system up to 8 weeks.

MATERIALS AND METHODS

Manufacturing MedRod™ systems

E2 was dispersed in the polydimethylsiloxane matrix and prepared mixture was solidified in a mold at elevated temperature to form cylindrical rods. Silicone tubings were used for covering the rods. Process resulted in elastic MedRods where compound is gently immobilised and steadily released (Figure 1).



Release testing *in vitro* and *in vivo*

The release of E2 was studied first in dissolution *in vitro* test and then in animal studies with rats. Intact and ovariectomized aged (OVX) female Sprague-Dawley (SD) rats were used. Approximately a 0.5 cm incision was made in the loose skin of the mouse's neck under light anesthesia, and a pocket was bluntly dissected caudally, in which the MedRod™ was gently installed using forceps. The incision was subsequently closed using tissue adhesive. HPLC and ELISA E2 immunoassays (American Laboratory Products Company (ALPCO)) were used to quantify hormone levels from the dissolution or serum samples. The macroscopic evaluation was conducted during necropsy and sensitive tissues for hormone metabolism, such as uterine, liver and long bones were harvested and weighed. Trabecular bone mineral density (BMD) was measured from tibias by peripheral quantitative computed tomography (pQCT).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank personnel of Pharmatest Services Ltd for their skilful technical assistance.

E2 IN VITRO RESULTS

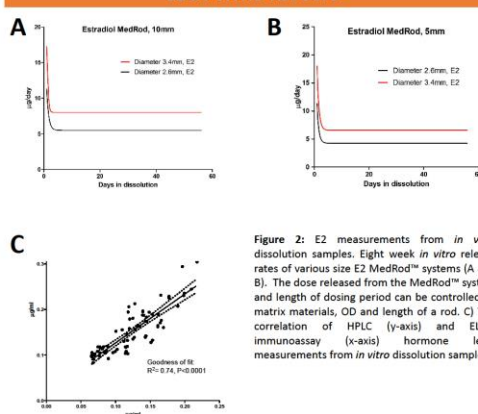


Figure 2: E2 measurements from *in vitro* dissolution samples. Eight week *in vitro* release rates of various size E2 MedRod™ systems (A and B). The dose released from the MedRod™ system and length of dosing period can be controlled by matrix materials, OD and length of a rod. C) The correlation of HPLC (y-axis) and ELISA immunoassay (x-axis) hormone level measurements from *in vitro* dissolution samples.

E2 IN VIVO RESULTS

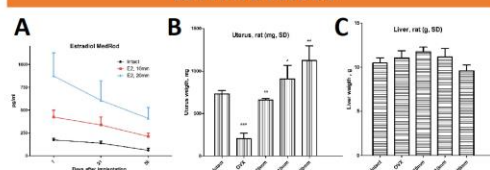


Figure 3: A) *In vivo* release rates of 10 and 20 mm E2 MedRod™ systems for 8 weeks in intact rats. B) Uterine weights and C) liver weights of intact and OVX rats at the end of the study. Uterine weights of intact and ovariectomized female rats were increased at the end of the study confirming anabolic effects of E2. Liver weights were slightly elevated after hormone treatment in response to increased metabolisms, but during necropsy no evidence of toxicity were observed.

BMD RESULTS

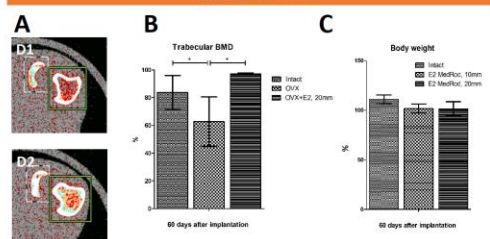


Figure 4: A) D1) Representative pQCT scan of tibial metaphysis of OVX control rats and D2) E2 MedRod treated rats representing the increased amount of trabecular bone in tibial metaphysis (green box). Relative change in trabecular BMD of OVX rats during the 8 week study. Relative change in body weight of intact rats during the 8 week study.

CONCLUSIONS

- ✓ The initial burst release characteristic to polymer based delivery systems was mild and observed within the first days of experimentation, after which the overall release profiles of E2 were highly stable for several months
- ✓ E2 levels were elevated during the *in vivo* study and release profiles were similar to *in vitro* release
- ✓ Uterine weights and trabecular BMD of female rats were increased at the end of the study confirming anabolic effects of E2
- ✓ Liver weights were slightly elevated after hormone treatment in response to increased metabolisms, but during necropsy no evidence of toxicity were observed
- ✓ MedRod™ systems were well tolerated and no irritation or inflammation was found from implant surrounding tissue, neither did any of the animals scratch the implanted site, thus proving comfortable and safe delivery system

SUMMARY

The MedRod™ system enables long-term and stable 17 β -estradiol delivery in preclinical osteoporosis studies. Benefits include also decreased handling stress for the animals and decreased variability which follows closely the 3R principle (Replacement, Reduction, and Refinement).

PreclinApps Ltd
www.preclinapps.com